Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Franke

ENZYMAKTIVITÄTEN DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE UND DER GLUTAMAT-DEHYDROGENASE IN DER LEBER VON RATTEN WÄHREND DER KANZERISIERUNG MIT N-NITROSOMORPHOLIN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfasst und der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Ilse Buchta

14. 12. 1971

1972

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Franke

ENZYMAKTIVITÄTEN DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE UND DER GLUTAMAT-DEHYDROGENASE IN DER LEBER VON RATTEN WÄHREND DER KANZERISIERUNG MIT N-NITROSOMORPHOLIN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfasst und der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Ilse Buchta

14. 12. 1971

Referent:	Privat-Dozent Dr. med. H. Haug
Korreferent:	Professor Dr. med. H. Franke
Dekan:	Professor Dr. med. K. H. Weis

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 2. 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

M E I N E N E L T E R N

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Literaturübersicht	5
	1. Besonderheiten der Geschwulstzelle	
	2. Tumorinduktion durch chemische Karzinogene	
	3. Tumorentstehung und Dosis	
	4. Morphologische Veränderungen während der Kanzerisierung	
	5. Untersuchungen der Enzymaktivitäten der AP und GLDH während der Kanzerisierung	
III.	Material und Methodik	17
IV.	Versuchsergebnisse	23
	A. Klinischer Zustand der Versuchstiere	
	B. Makroskopische Veränderungen der Leber	
	C. Diagramme und Tabellen	
	D. Makroskopisch sichtbare Leberveränderungen im Bild	
V.	Diskussion der Kurven	48
VI.	Diskussion	49
VII.	Zusammenfassung	52
VIII.	Literaturverzeichnis	53

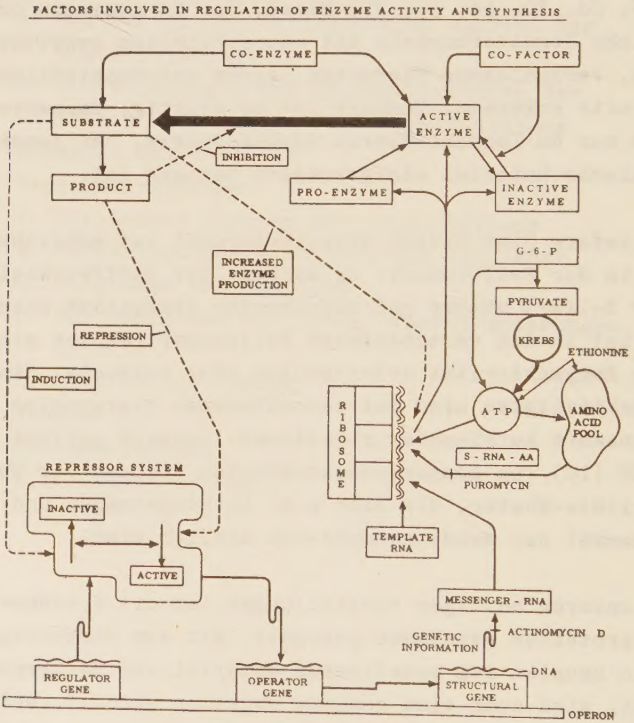
I. EINLEITUNG

In vorangegangenen Arbeiten in unserem Laboratorium wurde gezeigt, dass die Enzymaktivitäten von einer Reihe von Hauptkettenenzymen im Lebergewebe unter physiogischen Bedingungen in relativ engen Grenzen einreguliert werden. (6, 9, 28, 30, 54, 58, 77) Diese, nur in gewissen Grenzen mögliche Regulierbarkeit ist wahrscheinlich genetisch bedingt. Verschiedene Tierarten lassen unterschiedliche Regelbreite erkennen. Deshalb ist es wichtig, Massenversuche nur an Inzucht-Tieren durchzuführen, bei denen das genetische Material einigermassen homogen ist.

Der tiefere Sinn dieser Regulierbarkeit ist wahrscheinlich in der Zellökonomie zu suchen. Die Stoffwechselwege jeder Zellart müssen gut aufeinander abgestimmt sein, und dazu ist in den verschiedenen Zellkompartimenten eine gewisse Enzymaktivität erforderlich oder zulässig. Einige Enzymaktivitäten sind bei verschiedenen Tierspezies bemerkenswert aufeinander abgestimmt. Deshalb spricht BÜCHER (10) von proportionskonstanten Gruppen der Enzymaktivitäts-Muster, die sich z.B. im Rindermagen und im Flugmuskel der Wanderheuschrecke ähnlich sind.

Nach unseren heutigen Vorstellungen ist die Synthese von Enzymproteinen genetisch geregelt. Mit dem Proteintyp, dessen Bauplan dem genetischen Material des Zellkerns entstammt, wird auch eine gewisse Funktion vererbt, sei es über eine Strukturänderung der funktionierenden Enzymproteine selbst, sei es über Operatorgene, die den intrazellulären Umsatz des Proteins beeinflussen.

WEBER (75) hat in einem Diagramm diese Vorstellungen anschaulich dargestellt:



Eine der führenden Theorien der Krebsentstehung sagt aus, dass die Zelle durch eine toxisch-chemische oder physikalische Schädigung entdifferenziert wird. Sie gehorcht den Regelmechanismen des Organismus, die den Zellbestand der einzelnen Organe auf einer für die Spezies charakteristischen Zellmasse hält, nicht mehr.

Es gibt verschiedene Thesen über die karzinogenetische Wirkung, die nach ROUS (56) über eine fortlaufende Schädigung zu immer entdifferenzierteren Zellstadien führt. Während der Karzinogenese kommt es, wie wir noch ausführlicher beschreiben werden, zu Änderungen der Stoffwechselwege. Einer der ältesten und immer wieder bestätigten Befunde sind die Untersuchungen von WARBURG.(26,29) Er zeigte, dass sich Tumorgewebe durch einen Gärungsstoffwechsel auszeichnet.

In der vorgelegten Arbeit wollten wir untersuchen, in welcher Weise sich die Aktivitäten von zwei, schon unter anderen pathologischen und physiologischen Bedingungen untersuchten Enzymen im Verlauf der Kanzerisierung von Lebergewebe ändern. Wir zogen dazu das Modell der N-Nitrosomorpholinvergiftung von Rattenlebern heran.(3,5,14,50)
Mit NNM lassen sich mit einer gewissen Zuverlässigkeit Lebertumoren induzieren. Dabei kommt es über eine toxische Leberzellschädigung, die ein buntes histologisches Bild bietet, zum Auftreten von kleinen Hepatomen und Leberzellkarzinomen, die zu immer grösseren Tumoren heranwachsen. In unserem Versuch entstanden einige Tumorknoten, die doppeltbohnengross waren. Während in der gesunden Leber mit Wahrscheinlichkeit keine Karzinomzellen vorhanden sind, findet man in der grobknotig karzinomatös veränderten Leber mit Sicherheit neben den verbliebenen intakten oder toxisch geschädigten Leberzellen, Zellinfiltrationen, Bindegewebszellen ect., sehr viele Krebszellen.

Wir haben versucht, diese Veränderung der Leber an Hand des grobmorphologischen Bildes in verschiedene Stadien zu klassifizieren, die unten näher beschrieben werden. Da wir bei der Untersuchung der Enzymaktivitäten auf Zellhomogenate angewiesen waren, erfassten wir den jeweiligen Querschnitt aus den Enzymaktivitäten der verschiedenen Zellen, die die Leber in den einzelnen Stadien zusammensetzen. Selbstverständlich lassen sich diese Stadien nicht exakt klassifizieren, denn die Übergänge von der normalen Leber zur grobknotig tumorös entarteten Leber, wie wir sie in einigen Bildern dargestellt haben, sind fliessend. Wir haben zwar versucht, verschiedene Bezugssysteme aufzustellen, z.B. nach der aufgenommenen Giftmenge pro Tier und nach der Tränkungsdauer. Diese Bezugssysteme führen aber zu einer schlechten Erfassung des biologischen Geschehens. Da es uns nicht möglich war, jedem Tier eine entsprechende Giftmenge mittels einer Schlundsonde einzugeben und damit eine genaue Kenntnis der aufgenommenen Giftmenge ausgeschlossen war, lehnten wir eine Klassifikation nach diesem Gesichtspunkt ab.
Eine Einteilung nach der zeitlichen Gifteinwirkung wird dadurch zweifelhaft, dass bei der Tumorentstehung die Disposition eines jeden Tieres eine entscheidende Rolle spielt. Da wir jedoch nur Tiere in einer Gruppe zusammenfassen wollten, die im Prozess der Tumorentstehung auf etwa gleicher Stufe stehen, erwies sich die Einteilung nach makroskopisch sichtbaren Veränderungen als die gegebene.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, wie sich das Enzymmuster von Rattenlebern ändert, wenn in zunehmendem Masse aus toxischen Stadien heraus Karzinomzellen die Leber durchsetzen.

II. L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T

1.) Besonderheiten der Geschwulstzelle

Das hervorstechendste Merkmal der Geschwulstzelle ist eine Stoffwechselbesonderheit, die von O. WARBURG entdeckt wurde. Normale Körperzellen haben die Eigenschaft, solange ihnen genügend Sauerstoff zur Verfügung steht, Zucker nicht dadurch als Energiequelle zu verwenden, dass sie aus ihnen Milchsäure bilden. Sie tun dies nur dann, wenn sie sich unter Sauerstoffabschluss, also unter anaeroben Bedingungen befinden, z.B. während des embryonalen Wachstums oder bei Schädigungen. Viele Geschwülste verhalten sich nun ebenso, d.h. sie bilden selbst bei Sauerstoffzutritt aus Traubenzucker Milchsäure.(aerobe Glykolyse) O. WARBURG (29)

Ein besonderes Charakteristikum ist bei den Tumoren die erhöhte Wachstumsrate mit einer RNS - Konzentrationszunahme.(Basophilie). Studien über die erhöhte Basophilie der Tumorzellen unter dem Elektronenmikroskop zeigten, dass sie auf einer Anhäufung von freien Ribosomen beruht. Das endoplasmatische Retikulum mit dem Besatz von Ribosomen(gebundene Ribosomen) tritt ganz zurück. Ebenso fallen in den Tumoren vermehrte Mitosen auf, sowie häufig atypische Mitosen mit allen möglichen Teilungsstörungen. Sie haben aber nichts mit der Kanzerisierung zu tun, sondern sind Ausdruck der verstärkten Wachstumstendenz des Tumors. Bei grossen Tumorkomplexen reicht die Ernährung oft nicht mehr aus, da sich das Kapillarsystem nicht mehr adäquat mitentwickelt hat. Es treten Nekrosezonen auf. (2)
Das unkotrollierte Wachstum der Geschwulstzellen wird im Organismus dadurch verursacht, dass diese nicht im Stande sind auf die Korrelationsreize zu reagieren, welche das Wachstum normaler Zellen kontrolieren. Sie entziehen sich dadurch der Integration und stören durch die Autonomie ihrer Lebensäusserungen die Ganzheit des Wirtsorganismus mehr oder weniger. (7)

2.) Tumorinduktion durch chemische Karzinogene

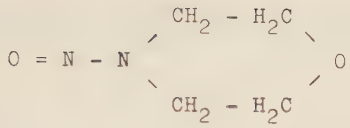
Bei weitem die meisten Erkenntnisse bei der Erforschung des Krebses sind an induzierten Tumoren gewonnen worden. Auf diese Weise kann man die einzelnen Phasen der Krebsentstehung besser kontrollieren und ein systematisches Studium der morphologischen und strukturellen Veränderungen sowie der Veränderungen im Stoffwechsel anstellen.

Als hervorragende Hilfsmittel zur Tumorinduktion bieten sich verschiedene chemische Karzinogene an. Die Azo-Verbindungen, die man ursprünglich verwendet hat (33,35), wurden durch wirksamere Karzinogene ersetzt: Dimethylnitrosamin (47), Diäthylnitrosamin (61), N-Nitrosomorpholin. (3,5,13,14,50)

Ein besonders günstiges Versuchsmodell ist die mit NNM vergiftete Rattenleber, in der sich bei geeigneter Dosierung des krebserzeugenden Giftes nach einer bestimmten Latenzzeit regelmässig multizentrische Leberzellgeschwülste entwickeln. (5,13) Das Leberparenchym stellt ein gutes Modell dar, weil es aus ziemlich homogenen Zellen zusammengesetzt ist. Seine Reaktion auf ein karzinogenes Stimulans ist grundsätzlich über grosse Areale gleich.(3)

In unserer Arbeit verwendeten wir zur Tumorinduktion das von DRUCKREY et al. (13) synthetisierte NNM, da es damit gelingt, äusserst schnell, sehr intensiv und ganz gezielt organotrop Karzinome in der Rattenleber zu erzeugen.

NNM:



LD 50 (Ratte) oral: 320 mg/kg; i.v.: 98 mg/kg (14,18)

Diese Organotropie ist abhängig von der chemischen Struktur der Substanz, ihrer Applikationsart und besonders auch von der Tierart. (10,14)
Speziell mit der Organotropie beschäftigten sich viele Autoren. (12,14,16,17,51,64,66)

3.) Tumorentstehung und Dosis

Des weiteren ist für die Entstehung und Häufigkeit der Karzinome die Dosis von entscheidender Bedeutung. (19,20,26) THOMAS (72) hat sich sehr intensiv mit der Dosisabhängigkeit der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Leberveränderungen beschäftigt: in den höchsten Dosen überwiegt die Parenchymschädigung so sehr, dass die Tiere an dieser Leberdystrophie zugrunde gehen können, bevor sich ein Tumor entwickelt; bei den niedrigsten Dosen treten Leberkrebse erst sehr spät auf, manchmal sogar überhaupt nicht, weil die Lebensspanne der Tiere offenbar dazu nicht ausreicht. Mit anderen Worten: Leberkrebse treten bei allen Dosen auf, wenn das Tier sie erlebt.

Die Tumorentstehung ist ein gleitender Vorgang von gutartig nach bösartig. Sie stellt eine progrediente Entartung dar.
Der Vorgang dieser "Progression" wurde von ROUS (56) in schematischer Weise am Modell der Haut dargestellt:

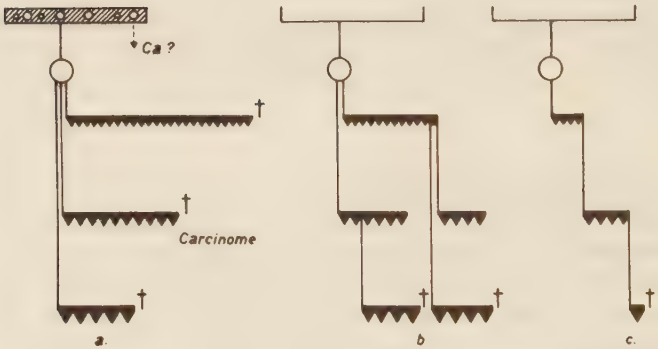


Abb.: 2 a-c

Möglichkeiten der schrittweisen Entstehung von drei Hautkrebsen mit verschiedenen Graden der Malignität.
(a) Die direkte (primäre) Krebsentstehung erscheint fraglich - alle drei Krebse gehen von einem einzigen Papillom aus (sekundäre Krebse). Tertiäre (b) und quarternäre (c) Krebse entstehen als Ergebnis von drei bzw. vier aufeinanderfolgenden neoplastischen Veränderungen. Die Höhe der Zacken entspricht dem Grade der Malignität.

4.) Morphologische Veränderungen während der Kanzerisierung

Bevorzugtes Untersuchungsobjekt der Morphologen und Cytologen sind die Vorstufen der Tumorentwicklung. Seit nun kanzerogene Substanzen bekannt sind, mit welchen gezielt Tumoren induziert werden können, haben zahlreiche Autoren dieses Problem unter den verschiedensten Gesichtspunkten behandelt (23,25,31,37,48,49,59,60,61,70,74).

Über die Klassifizierung der durch Azo-Farbstoffe erzeugten Lebertumoren, finden sich in der Literatur verschiedene Angaben. Vergleicht man diese Klassifizierungen miteinander, so stellt man fest, dass alle Autoren Hepatome, also Leberzellkarzinome beschreiben, die sie in verschiedene Untergruppen einteilen, je nach dem, ob es sich um solide, trabekuläre oder drüsige Formen handelt.

SANDNER und BÜRKLE (57) beschrieben die Induktion maligner Tumoren durch gleichzeitige Verfütterung von Nitrit und sekundären Aminen. Einer makroskopischen Beschreibung fügten sie histologische Befunde an, die sich besonders mit den auffälligsten makroskopischen Veränderungen befassten. KENDREY und NEMETH (34) haben die Histogenese durch Thioazetamid induzierter, cholangiozellulärer Karzinome bei Ratten studiert. Sie konnten zwei Abschnitte unterscheiden: in der ersten Phase zeigte sich die Umgestaltung eines bedeutenden Teiles der Leberzellen in Gallengangsepithelzellen. Dieser Vorgang ging mit dem Erscheinen tubulärer Strukturen einher. In der zweiten Phase erfolgte eine Atypie des Epithels dieser Tubuli. Dieser Vorgang führte in den meisten Fällen über Cholangiofibrose zur Ausbildung cholangiozellulärer Karzinome.

C. THOMAS und D. SCHMÄHL (73) beschrieben die Morphologie der Lebertumoren bei Maus und Meerschweinchen, die nach Tränkung mit Diäthylnitrosamin aufgetreten waren. Beim

Meerschweinchen (Tagesdosis:3-5 mg/kg, Gesamtdosis: 1200 mg/kg) traten Leberzellkarzinome auf, bei der Maus (Tagesdosis:13 mg/kg, Gesamtdosis:2340 mg/kg) maligne Hämangioendotheliome der Leber. Bei der Maus trat trotz der hohen Tagesdosis keine Zirrhose auf, wogegen bei dem Meerschweinchen immer eine vorhanden war. Sie nahmen daher an, dass das Ausmass der zirrhogenen Wirkung der Substanz nicht nur abhängig ist von der Höhe der zugeführten Tagesdosis, sondern auch von der Tierart: je grösser diese ist (Hund, Meerschweinchen), desto besser kommt es zur Entwicklung von Zirrhosen.

SCHMÄHL et al. (63) erzeugten mit Diäthylnitrosamin und 4-Dimethylaminoazobenzol Tumoren. Alle Tiere wurden solange behandelt, bis sich palpatorisch an der Leber ein Krebswachstum feststellen liess. Das war in der Regel dann der Fall, wenn ein Tumorknoten reichlich Kirschkerngrösse erreicht hatte. Makroskopisch auffällige Organe wurden histologisch untersucht. So konnten sie Übergangsformen zwischen den einzelnen Tumortypen nachweisen, z. B. zwischen Pseudogallengangswucherungen und Zystadenomen einerseits, sowie Adenohepatomen und soliden Leberzellkarzinomen andererseits, wobei der Leberzellursprung zu erkennen blieb.

LAUBER und DANNENBERG (40) induzierten Tumoren bei Ratten mit p-Dimethylaminoazobenzol. Besondere Aufmerksamkeit schenkten sie den histologischen Veränderungen, die der krebsigen Entartung vorausgehen. Die ersten morphologischen Veränderungen bestanden in einer Vergrösserung der Leberzellkerne, die sich in späteren Stadien zu einer ausgesprochenen Kernunruhe entwickelte. Weiter fiel eine anfangs meist diffuse, fein bis mitteltropfige Verfettung der Leberzellen auf, die in späteren Stadien nicht mehr zu beobachten war. Offenbar handelte es sich bei dieser

Verfettung um eine unspezifische toxische Wirkung. Sehr frühzeitig begann eine Wucherung der Gallengänge, die sich zunächst auf die portalen Felder beschränkte, später aber auch in die Acini eindrang. Es entstand ein zirrhoseähnliches Bild.

SCHMÄHL und THOMAS (62) erzeugten mit N-N-Dinitrosopiperazin bei Mäusen Lebertumoren. Sie fanden maligne Hämangioendotheliome und maligne Hepatome. Bei den Hepatomen handelte es sich um teils solide, teils trabekulär gestaltete Leberzellkarzinome. Weiter beobachteten sie Parenchymnekrosen, Abszesse sowie Verfettung und Eiweisseinlagerungen im Cytoplasma der Leberzellen; einen zirrhotischen Umbau konnten sie nicht nachweisen.

BANNASCH (4) verwendete als Versuchsmodell die mit NNM vergiftete Rattenleber. Er unterschied zwischen zwei grundsätzlich verschiedenen Typen toxisch geschädigter Parenchymzellen:

a.) zentraler Schädigungstyp (regressive zirrhogene Parenchymläsion):
charakteristisch ist der weitgehende oder vollständige Schwund des cytoplasmatischen Glykogendepots und eine gleichzeitig damit ablaufende Disorganisation des Ergastoplasmas. Diese Erscheinungen sind umso stärker ausgeprägt, je höher die angewandte Giftkonzentration (Einzeldosis) ist. Sie sind demnach als Folge einer "Konzentrationswirkung" des Karzinogens im Sinne von DRUCKREY und KUPFMÜLLER (15) anzusehen und müssen als Zeichen einer unspezifischen toxischen Zellschädigung gewertet werden. Die meisten Zellen des zentralen Typs gehen unter dem Bild einer Koagulationsnekrose zugrunde und bedingen damit die Entstehung von Leberfibrosen und Zirrhosen.

b.) peripherer Schädigungstyp (adaptive, präkanzeröse Parenchymläsion):
wesentlichstes Merkmal ist eine übermässige Glykogenspeicherung. Diese bewirkt eine "Dislokation" und relative Reduktion des Ergastoplasmas. Ausserdem entwickelt sich in einem Teil der Speicherzellen eine Hypertrophie des agranulären endoplasmatischen Retikulums (53). Das Karzinogen induziert also eine herdförmige Glykogenose (Glykogenspeicherkrankheit), deren Ursache vermutlich in toxisch bedingten, irreversiblen Enzymdefekten zu suchen ist.

Die Hepatome entwickeln sich nach BANNASCH regelmässig aus den übermässig glykogenspeichernden Parenchymherden. Die Wende zum Hepatom wird morphologisch markiert durch eine gleichzeitig damit ablaufende Ribosomenvermehrung (Chromatogenesis) (52), oft begleitet von einer transitorischen cytoplasmatischen Verfettung.

C. THOMAS (72) hat sich eingehend mit der Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Leberveränderungen bei der Ratte beschäftigt. Seine histologischen Befunde ordnete er in zwei Gruppen ein: solche, die als Ausdruck einer Gewebsschädigung zu deuten sind, d. h. regressive bzw. degenerative Veränderungen darstellen, und solche, die als Zeichen einer Gewebsneubildung bis zur Tumorentwicklung aufzufassen sind, sozusagen "progressive" Veränderungen. Regressive und progressive Veränderungen verbinden sich in ganz verschiedener Weise zu einem sehr abwechslungsreichen Bild, das in seiner Zusammensetzung eine deutliche Abhängigkeit von der Tagesdosis bzw. von der verabreichten Gesamtdosis zeigt.

GRUNDMANN und SIEBURG (27) gliedern die Veränderungen der Rattenleber während der Kanzerisierung in vier Phasen:

1. In der Läppchenperipherie Vermehrung der cytoplasmatischen Basophilie; blasige Schwellung des Cytoplasmas.
2. Grobblasige Umwandlung des ganzen Cytoplasmas unter Randverlagerung und teilweisem Verlust der basophilen Schollen; Kerne erheblich vergrössert.
3. In den Läppchenzentren erfolgt der Umschlag in das Karzinom. Er beginnt mit einem plötzlichen Auftreten kleinkerniger, diploider Zellnester, die durch eine sehr starke Basophilie und eine Glykogenverarmung gekennzeichnet sind. Die primären Krebsknoten vergrössern sich rasch und werden makroskopisch als kleine Herdchen erkennbar.
4. Die Herdchen konfluieren miteinander zu den typischen Krebsknoten und setzen in einem Teil der Tiere Metastasen.
   Die beobachteten Karzinome sind hepatozellulären Ursprungs.

5.) Untersuchungen der Enzymaktivitäten der Alkalischen Phosphatase und Glutamatdehydrogenase während der Kanzerisierung

Untersuchungen von Enzymaktivitäten haben ihren gesicherten Platz in der klinischen Diagnostik. Die einzelnen Organe sind entsprechend ihren verschiedenen Funktionen quantitativ, teilweise auch qualitativ unterschiedlich mit Enzymen ausgestattet. Diese Enzymmuster sind für die Organe charakteristisch. Bei der Erkrankung eines Organs und der Schädigung seiner Parenchymzellen treten Enzyme aus den Zellen in das Serum über. Es kommt zu einem Anstieg einzelner Enzymaktivitäten im Serum (31). In dieser Arbeit wird die Alkalische Phosphatase und die Glutamatdehydrogenase speziell bearbeitet.
Wir haben die Enzymaktivitätsbestimmungen im Homogenat durchgeführt. in der Literatur findet man kaum einen Hinweis auf derartige Messungen. Die Autoren beschreiben fast ausschliesslich die Enzymaktivitäten im Serum und deren Anwendung zur Diagnostik und Verlaufskontrolle von Lebererkrankungen. (1,8,21,36,38,65,67,68)
Lediglich zwei Arbeiten konnten wir finden, die sich mit Enzymaktivitäten der AP und der GLDH während der Kanzerisierung beschäftigten. Dabei haben wir unter anderem die letzten fünfzehn Jahrgänge der folgenden Zeitschriften systematisch durchgesucht: Zeitschrift für Krebsforschung, British Journal of Cancer, Arzneimittelforschung, Zeitschrift für Krebsforschung und Krebsbekämpfung.
Die Autoren, die Enzymaktivitäten während des Vorgangs der Kanzerisierung beschrieben, haben meist sehr verschiedene Versuchsbedingungen gewählt, so dass es äusserst schwierig ist, die Befunde zu einer sinnvollen Gesamtschau zu ordnen.

Die Alkalische Phosphatase wird im Serum erhöht gefunden bei allen Zuständen, die mit einer Cholostase einhergehen, unabhängig von deren Ätiologie und Lokalisation (36). Die AP des Blutserums hat für die Klinik Bedeutung, weil sie bei gewissen Erkrankungen der Knochen erhöht ist. Auch bei Affektionen der Leber und der Gallengänge (Gallenstau durch Stein, Krebsmetastasen in der Leber) findet man im Serum erhöhte Phosphatasewerte (45).
E. SCHMIDT et al. (65) fanden, dass das Leberkarzinom auf dem Boden einer Leberzirrhose gewöhnlich keine spezifischen Veränderungen der Enzymaktivitäten im Serum verursacht. Bei Metastasenlebern fanden sich mässige Anstiege der Aktivitäten der Transaminasen, der PK, der MDH, der ICDH und je nach Ausdehnung der Metastasen auch der AP.
FISHMAN (24) fand, dass im Vergleich mit einer gesunden Leber die Enzymzusammensetzung in einem induzierten tierischen Hepatom entweder keine Aktivitätsänderung, eine verminderte oder zunehmende zeigt. Bei primären Hepatomen fiel auf, dass nur die Aktivität der AP anstieg.
TESSMAN (71) hat fermenthistochemische Untersuchungen zur Darstellung der unspezifischen (alkalischen und sauren) Monophosphataseester in Geschwulstmetastasen durchgefürht. Die AP stellte sich in den Tumorzellen im allgemeinen nicht dar. Deutlich fermentaktiv erschienen die Blutgefässe des Geschwulststromas. Eine intensive Reaktion zeigte sich im Bereich grösserer Tumornekrosen. Eine deutliche Fermentaktivitätszunahme war in den an die Metastase grenzenden Leberzellen zu beobachten. Es erhob sich die Frage, ob in der fermentreichen Leberregion eine Ausscheidungsstörung der extrahepatisch entstandenen Phosphatase vorlag, oder in dem Leberabschnitt selbst eine vermehrte Fermentsynthese bestand. Fernerhin wird von A. CANTAROW (11) die Meinung vertreten, dass die erhöhte Phosphataseaktivität nicht auf eine Neubildung von Fermenten, sondern auf eine verstärkte Aktivierung der vorhandenen Fermente durch Überschuss an Aktivatoren oder Mangel an Inhibitoren zurückzuführen sei.

Nach E. LETTERER (44) kann die positive Reaktion der AP in den nekrobiotischen Geschwulstzellen, bei fehlender Fermentaktivität der Karzinomzellen derselben Metastase, im Rahmen einer pathischen Stoffwechselsteigerung zustande kommen.
Die GLDH ist als eines der wichtigsten Mitochondrienenzyme in normaler menschlicher Leber hoch konzentriert; in Rohhomogenaten beträgt der Anteil der GLDH über 0,3% des gesamten löslichen Proteins. In Rohextrakten aus primären Leberkarzinomen findet man eine sehr niedrige Aktivität der GLDH.
LEHMANN (41) befasst sich mit der GLDH in primären Leberzellkarzinomen. Im Tierexperiment wurden in Hepatomen folgende Veränderungen beobachtet:

a) eine veränderte genetische Codierung mit Auftreten neuer, jedoch physiologischer Weise im Organismus vorhandener, molekularer Formen.
b) echte Enzymvarianten.
c) eine Blockierung der Enzyminduktion bei strukturell unverändertem Enzymmolekül.

Neue molekulare Formen in hepatozellulären Karzinomen im Vergleich zur Enzymausstattung der normalen Leberzelle wurden für die LDH und die AP nachgewiesen.

III. M A T E R I A L U N D M E T H O D I K

1.) Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten uns männliche Albinoratten vom Stamm Wistar B 47. Zehn Tage vor Beginn des Hauptversuches holten wir die Tiere aus einer Labortierzucht+; in dieser Zeit konnten sich die Tiere an ihre neue Umgebung gewöhnen. Wir versuchten, schädigende äussere Einflüsse auf die Tiere gering zu halten; aus diesem Grunde betrug die Raumtemperatur konstant 20-23 Grad Celsius. Durch Halten der Tiere in Käfigen mit Gitterböden wollten wir eine Beeiflussung unserer Versuchsergebnisse durch Coprophagie verhindern. (69) Zu Beginn unseres Hauptversuches waren die Tiere etwa sieben Wochen alt; ihr Gewicht lag zwischen 140 und 160 Gramm.

2.) Ernährung

Alle Tiere erhielten Trockenfutter "Altromin R 15" ad libitum. Altromin enthält Vitamine, Spurenelemente, Mineralien sowie ein ausgewogenes Kalorienangebot, das speziell für Ratten geeignet ist. Als Trinklösung diente bei den Kontrolltieren Leitungswasser, während wir für unsere Versuchstiere täglich eine frische 12mg % N-Nitrosomorpholin-Lösung ansetzten. Die tägliche Trinkmenge ermittelten wir durch Wiegen des Restes, der in der Flasche verblieben war.

3.) Gruppenbildung

Entsprechend dem Aufbau unseres Versuches bildeten wir anfangs vier Serien von Tieren:

15 Tiere für Vorversuche
100 Tiere, die mit NNM getränkt wurden
55 Kontrolltiere
10 Tiere im Auslassversuch

+ Grosskreuz, Unfinden/Hassfurt

Alle Tiere wurden innerhalb der einzelnen Serien streng voneinander getrennt gehalten.

4.) Vorversuche

Während der zehntägigen Eingewöhnungsdauer unserer Tiere übten wir an 15 Tieren die Einzelphasen unseres Hauptversuches. Als besonders vorteilhaft erwies es sich, dass wir dabei schon die günstigsten Verdünnungen des Leberhomogenates für die zu untersuchenden Enzyme ermittelten.

5.) Hauptversuch

In Abständen von jeweils zehn Tagen töteten und untersuchten wir 10 mit NNM getränkte Tiere; fünf gesunde Tiere dienten jedesmal als Kontrolltiere. Aus der Anzahl unserer Versuchstiere ergab sich somit eine Versuchsdauer von 100 Tagen. Nach weiteren zehn Tagen - also nach 110 Tagen - töteten wir weitere zehn Tiere. Über die Dauer von 100 Tagen sind sie ebenfalls mit Altromin und der 12mg%igen NNM Lösung ernährt worden; in den letzten zehn Tagen wurde diese Lösung abgesetzt und sie erhielten dafür Leitungswasser. Wir wollten so die toxische Wirkung des NNM ausschalten.

6.) Operationstechnik und Gewinnung der Enzymlösungen

Das Töten der Tiere erfolgte jeweils zur gleichen Tageszeit, um tageszeitliche Schwankungen der Enzymaktivitäten auszuschliessen. Jedes Tier wurde zunächst in einem luftdichten Behälter mit Äther kurz betäubt,um es ungestört wiegen zu können. Nach dem Wiegen vertieften wir die Narkose. Als Narkosemittel verwendeten wir deshalb Äther, weil er nach Meinung verschiedener Autoren keine hepatotoxisch Wirkung haben soll.
Die narkotisierte Ratte wurde nun mit vier Klemmen auf einem Operationstisch fixiert. Um einem Nachlassen der Narkosewirkung vorzubeugen, stülpten wir dem Tier einen

Erlenmeyerkolben über den Kopf, in dem sich ätherge-
tränkte Gaze befand. Das Abdomen wurde mit einem cra-
nialwärts gerichtetem Scherenschnitt eröffnet. Weitere
zwei Schnitte rechts und links des Sternums eröffneten
den Brustraum. Jetzt entnahmen wir mit einer Record-
spritze aus dem noch pulsierenden rechten Ventrikel
ca. 5 cm Blut, welches zur Analyse im Vielfachanalysator
vorbereitet wurde. Im Anschluss daran wurde die vena
cava inferior knapp über dem Diaphragma durchtrennt.
Vom linken Ventrikel aus wurde eine Spülung des grossen
Kreislaufes mit 50 ml 0,9% NaCL - Lösung (4 Grad Celsius)
durchgeführt. Um eine maximale Blutleere der Leber zu
erreichen, wurde anschliessend die Leber separat von der
vena portae aus mit 30 ml der gleichen Lösung gespült.
Dieses Vorgehen entsprach modifiziert dem von LUDEWIG (46)
und PROSCH (54). Die so vorbereitete Leber wurde in toto
entfernt, mit Tupfern getrocknet und gewogen. Auf der
analytischen Waage wurde ein Gramm zur Gewinnung des
Leberhomogenates abgewogen; weiter wurde ein Gewebestück
zur patho-histologischen Untersuchung entnommen.
In einem Glashomogenisator wurde bei geringer Drehzahl
ein Gramm Leber homogenisiert, nachdem wir 9 ml 0,9%
NaCl-Lösung zugegeben hatten. Das so gewonnene Homogenat
zentrifugierten wir anschliessend 15 Min. bei einer Um-
drehungszahl von 3000/Min. Der so gewonnene Überstand
stellte unsere Stammlösung 1:10 dar, die wir bei der
Bestimmung der Enzymaktivitätsänderungen entsprechend
der Vorversuchsergebnisse mit 0,9% NaCl verdünnten.

7.) Enzymaktivitätsbestimmungen

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Enzymaktivi-
täten mit Testpackungen von Boehringer bestimmt:

a.) Die alkalische Phosphatase (AP)

Die AP katalysiert folgende Reaktion:

p - Nitrophenylphosphat $\xleftarrow{Mg}$ p - Nitrophenol+(P)

Die Enzymaktivität wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm
gemessen.

b.) Die Glutamat - Dehydrogenase (GLDH)

Die GLDH katalysiert folgende wasserstoffübertragende Reaktion:

$$a\text{-Ketoglutarat} + NADH + NH_4 \rightleftarrows Glutamat + NAD^+ + H_2O,$$

deren Gleichgewicht weit auf der Seite von Glutamat und NAD liegt. Man bestimmt die Aktivität der GLDH aus der Geschwindigkeit der durch diese Reaktion hervorgerufenen NADH - Abnahme. NADH ist die Messgrösse und auf Grund seiner Absorption bei 366nm leicht zu bestimmen.
Die Aktivitäten beider Enzyme wurden in einem Eppendorf - Photometer mit automatischer Schreibvorrichtung gemessen. Die verwendeten Küvetten hatten eine Schnittdichte von 1 cm. Bei der AP verwendeten wir die Stammlösung direkt, bei der GLDH eine Verdünnung der Stammlösung von 1:10. Diese Verdünnungsfaktoren sind bei den später angeführten Werten bereits berücksichtigt. Die abgelesenen Extinktionsänderungen rechneten wir nach folgender Formel in (Milli -) Units um:

$$EA\ (mU/gr) = \Delta E/min \cdot \frac{Gesamt\text{-}Vol. \cdot 1000 \cdot Fv}{3{,}3 \cdot Enzym\text{-}Vol. \cdot d}$$

Dabei bedeutet:

EA	= Enzymaktivität
Gesamt-Vol.	= Summe aller Volumina des Testeinsatzes in der Küvette
1000	= Umrechnungsfaktor auf mU
Fv	= Verdünnungsfaktor
3,3	= Mikromolarer Extinktionskoeffizient
Enzym-Vol.	= Volumen des Homogenats bzw. dessen Verdünnung im Testeinsatz
d	= Schichtdicke der Küvette

8.) Proteinbestimmung

Bestimmt wurde auch der Proteingehalt im Leberextrakt, da die Ergebnisse an Aussagekraft gewinnen, wenn man die Enzymaktivitäten auf den Proteingehalt bezieht. Wir benutzten

hierfür die Biuret - Methode nach WEICHSELBAUM (76), da SCHAUM (58) nachweisen konnte, dass die Proteinbestimmung nach KJELDAHL mit der Biuret - Methode weitgehend übereinstimmt. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 546 nm gegen einen Leerwert; die Schichtdicke der Küvette betrug 2 cm.

9.) Statistik

Ausgangsbasis für alle Berechnungen waren die Werte der spezifischen Enzymaktivität für jedes Tier. Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen, wurden die Enzymaktivitäten für folgende Bezugssysteme bestimmt:

a) Spezifische Aktivität = Enzymaktivität / g Leber

b) Gesamtaktivität = Spezifische Aktivität x Lebergewicht

c) Spezifische proteinbezogene Aktivität = $\frac{\text{Spez. Aktivität}}{\text{Biuretwert}}$

d) Proteinbezogene Gesamtaktivität = $\frac{\text{Gesamtaktivität}}{\text{Biuretwert}}$

e) Spezifische Aktivität x $\frac{\text{Körpergewicht}}{\text{Lebergewicht}}$

f) Spezifische proteinbezogene Aktivität x $\frac{\text{Körpergewicht}}{\text{Lebergewicht}}$

g) Aktivität/100 g Körpergewicht = $\frac{\text{Spez.Aktivität x 100}}{\text{Körpergewicht}}$

Alle Berechnungen wurden mit Hilfe des Computers EL X 8 des Rechenzentrums der Universität Würzburg durchgeführt, wofür uns Herr Dr. Knauer vom "Institut für angewandte Mathematik" in Würzburg das Rechenprogramm erstellte.
Die gefundenen Werte wurden alle graphisch dargestellt, wobei die Standardabweichung jeweils senkrecht zum Mittelwert nach oben und unten aufgetragen wurde.
Um Abweichungen der EA zwischen den einzelnen Gruppen als statistisch gesichert oder nicht gesichert ansehen zu können, führten wir die Varianzanalyse durch. In den Tabellen wird die Irrtumswahrscheinlichkeit P angegeben.
Die Ablesung der Signifikanzschranken erfolgte in den "Wissenschaftlichen Tabellen", Geigy.

10.) Klassifizierung

Die oben angeführten sieben Bezugssysteme liessen wir für alle Tiere nach drei Gesichtspunkten berechnen:

a) Aufgenommene Giftmenge
b) Einwirkung des Giftes
c) Morphologische Veränderungen der Leber

Wir entschlossen uns zu folgender Einteilung unserer Versuchstiere, die sich uns auf Grund der morphologischen Veränderungen angeboten hat.

1. Gruppe: normale Leber bei Gifteinwirkung
2. Gruppe: Konsistenzveränderung (Verhärtung)
3. Gruppe: rauhe Oberfläche der Leber
4. Gruppe: stecknadelkopfgrosse Knoten
5. Gruppe: reiskorngrosse Knoten
6. Gruppe: erbsen- bis bohnengrosse Knoten

IV. V E R S U C H S E R G E B N I S S E

A. Klinischer Zustand der Versuchstiere:

Unsere Kontrolltiere entwickelten sich während der gesamten Versuchsdauer bis zu einem Durchschnittsgewicht von 330-360 Gramm. Dagegen bewirkte die Tränkung mit NNM eine starke Beeinträchtigung des Wachstums, teils bedingt durch verminderte Fresslust. Sie erreichten lediglich ein Durchschnittsgewicht von 210-240 Gramm. Die Tiere wurden apatnisch, zeigten verlangsamte Reaktionen, sie bekamen ein struppiges, gelbliches Fell, sie schliefen viel. In den ersten drei Wochen starben acht Tiere spontan auf Grund der toxischen Wirkung des NNM. Es tauchte die Gefahr des Kannibalismus auf.

B. Makroskopische Veränderungen der Leber:

Schon wenige Tage nach Beginn der Gifteinwirkung konnten wir beim Spülen mancher Lebern eine deutliche Verhärtung feststellen. Die Oberfläche war glatt, die Farbe unverändert.
Allmählich entstand eine feinkörnige, rauhe Oberfläche.
Im weiteren Verlauf konnten wir die Entstehung von zahlreichen, relativ regelmässig über die Leber verteilten, gut abgegrenzten Geschwulstknötchen erkennen. Die zunächst kleinen grauweissen Herdchen, die einer Miliartuberkulose ähnelten, wuchsen bis Erbsen- oder sogar Bohnengrösse heran. Gegen Ende des Versuches entdeckten wir Knoten, die, bei sonst äusserlich relativ unveränderter Leber, fast einen ganzen Leberlappen einnahmen. Die meisten dieser massiven Knoten ulzerierten. So erklärten wir uns den Tod von drei weiteren Versuchstieren gegen Ende des Versuches durch blutige Zerstörung der Tumorknoten mit nachfolgender innerer Verblutung. Äusserst bemerkenswert erschien uns, dass manche Tiere zu diesem Zeitpunkt fast gar keine sichtbaren Leberveränderungen zeigten.

C. Diagramme und Tabellen:

Die in den Tabellen angegebenen Werte sind die arithmetischen Mittel aus unseren einzelnen Gruppen.
Sie setzen sich wie folgt zusammen:

Gruppe 1:	27 Tiere	
Gruppe 2:	20 Tiere	
Gruppe 3:	21 Tiere	
Gruppe 4:	18 Tiere	A: 4 Tiere
Gruppe 5:	11 Tiere	A: 3 Tiere
Gruppe 6:	3 Tiere	A: 3 Tiere

Zeichenerklärung:

N	Anzahl der Tiere in einer Gruppe
Gr	Gruppe im Dauerversuch
GrA	Gruppe im Auslassversuch
EA	Enzymaktivität
NNM	N - Nitrosomorpholin
M	Mittelwert
St	Standardabweichung
A	Auslassversuch
K	Körpergewicht
L	Lebergewicht
1 U	1 Unit = Enzymaktivität, die ein Mol Substrat pro Minute und Bezugsgrösse bei 25° C umsetzt
1mU	1 milli-Unit = 1/1000 U
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
g	Gramm
AP	Alkalische Phosphatase
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase

Techn. Anmerkung:
Die Tabellen beginnen mit Nr.3, um eine Übereinstimmung mit den entsprechenden Diagrammen herzustellen!

Diagramme und Tabellen

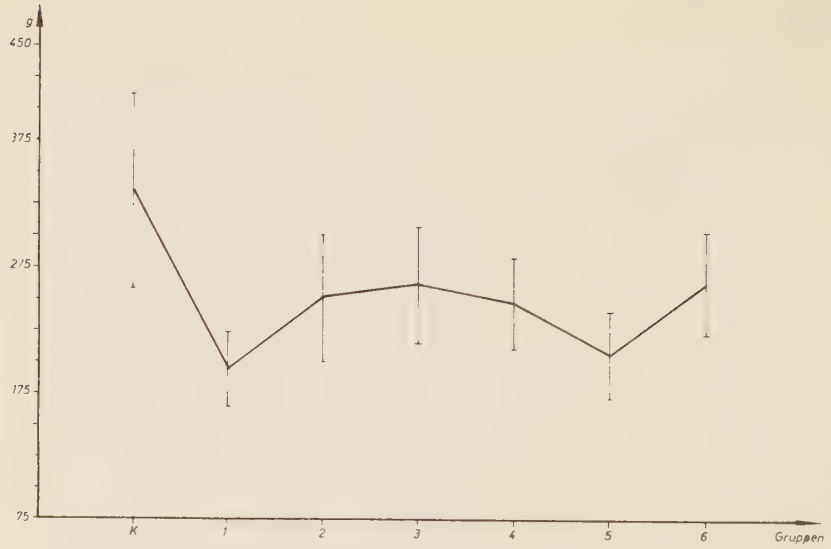


Abb. 3 Tötungsgewicht

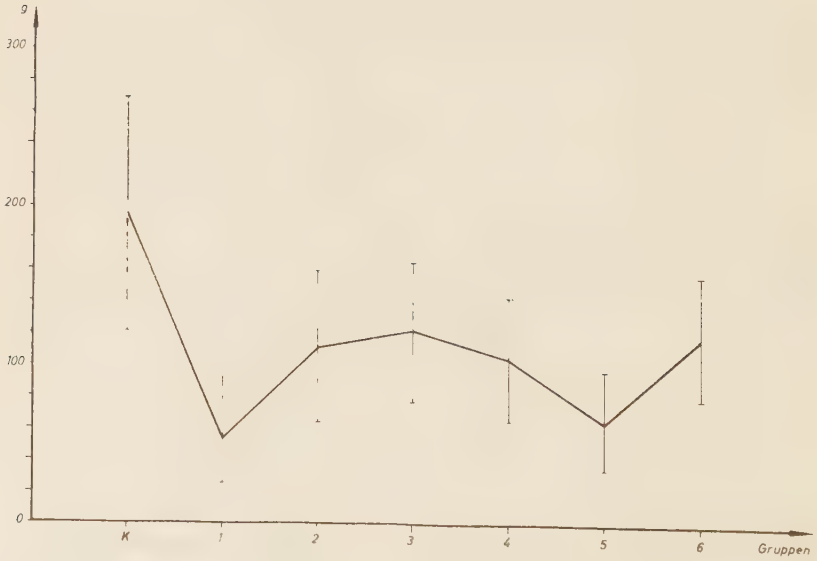


Abb. 4 Gewichtszunahme

Tabelle 3
Tötungsgewicht (g)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	194,59	27,69	1	-	-	-
2	20	251,70	47,67	2	-	-	-
3	21	262,19	43,52	3	-	-	-
4	18	244,78	38,21	4	4	312,00	32,29
5	11	206,73	31,28	5	3	271,00	46,66
6	3	258,67	38,43	6	3	248,00	19,28
K	55	335,05	74,81	K	55	335,05	74,81
		P < 0,01				P > 0,05	

Tabelle 4
Gewichtszunahme (g)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	54,66	27,68	1	-	-	-
2	20	111,70	47,67	2	-	-	-
3	21	122,19	43,52	3	-	-	-
4	18	104,78	38,21	4	4	172,00	32,29
5	11	66,54	31,10	5	3	131,00	46,66
6	3	118,00	38,62	6	3	108,00	19,28
K	55	195,60	74,01	K	55	195,60	74,01
		P < 0,01				P > 0,05	

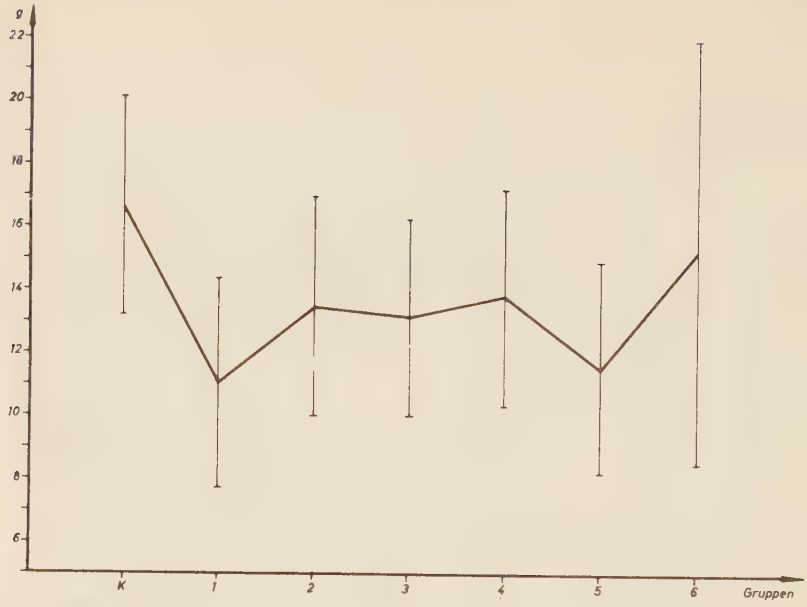


Abb. 5 **Lebergewicht**

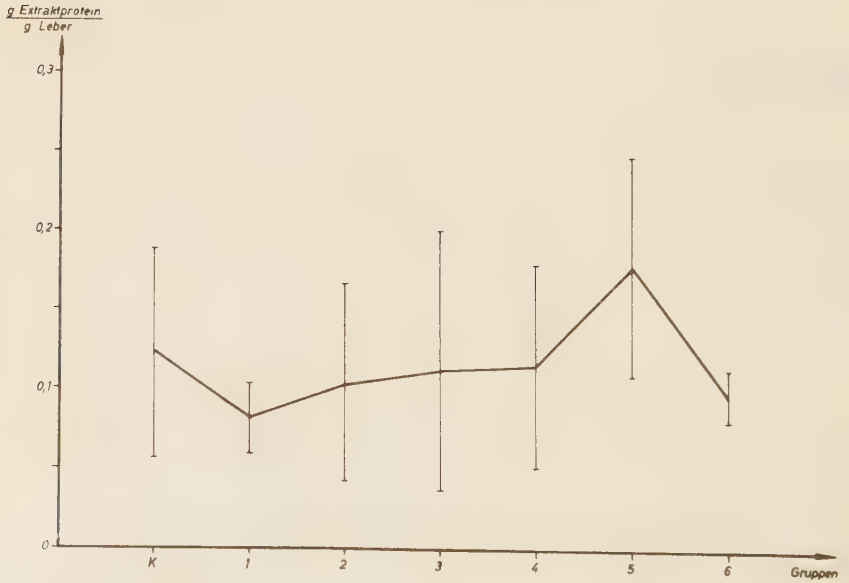


Abb. 6 **Extraktprotein**

Tabelle 5
Lebergewicht (g)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	11,03	3,25	1	-	-	-
2	20	13,48	3,48	2	-	-	-
3	21	13,15	3,07	3	-	-	-
4	18	13,78	3,42	4	4	23,34	4,16
5	11	11,56	3,34	5	3	18,59	1,06
6	3	15,19	3,63	6	3	20,62	3,19
K	55	16,61	3,43	K	55	16,61	3,43
		P < 0,01				P > 0,05	

Tabelle 6
g Extraktprotein / g Leber

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	0,082	0,024	1	-	-	-
2	20	0,105	0,063	2	-	-	-
3	21	0,120	0,082	3	-	-	-
4	18	0,116	0,065	4	4	0,095	0,028
5	11	0,180	0,063	5	3	0,103	0,023
6	3	0,097	0,018	6	3	0,151	0,039
K	55	0,124	0,067	K	55	0,124	0,067
		P < 0,05				P > 0,05	

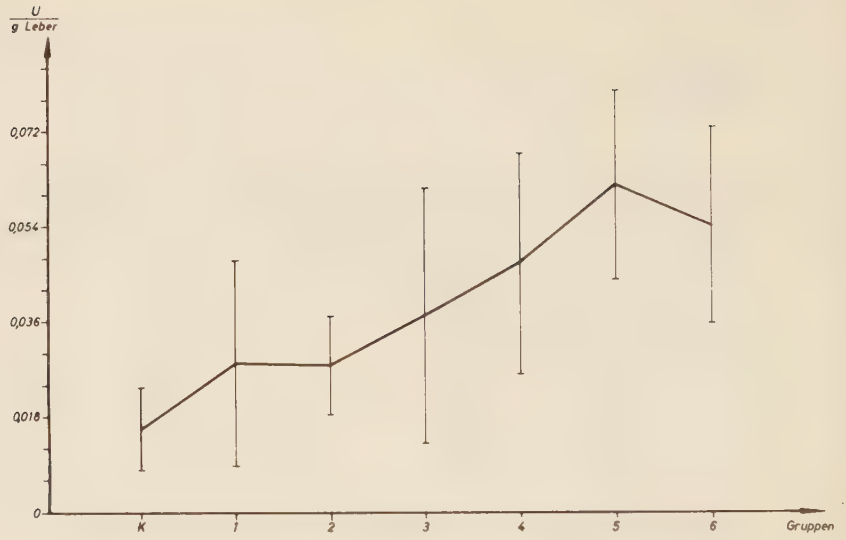


Abb. 7 Spezifische Aktivität der AP

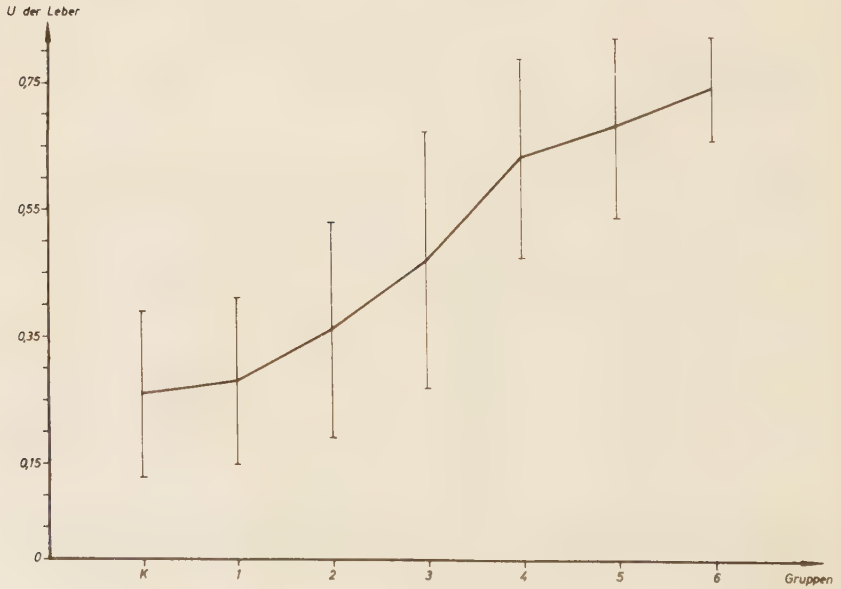


Abb. 8 Gesamtaktivität der AP

Tabelle 7
Spezifische EA der AP
(mU / g Frischgewicht)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	27,88	19,33	1	-	-	-
2	20	26,65	10,22	2	-	-	-
3	21	36,78	24,33	3	-	-	-
4	18	46,87	21,51	4	4	35,50	18,65
5	11	63,64	24,59	5	3	53,00	12,73
6	3	53,73	18,01	6	3	183,33	36,84
K	55	15,74	6,96	K	55	15,74	6,96
	P	$<$ 0,01			P	$>$ 0,05	

Tabelle 8
Gesamtaktivität der AP
(mU)im ganzen Organ)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	277,26	133,28	1	-	-	-
2	20	360,87	170,74	2	-	-	-
3	21	469,90	205,31	3	-	-	-
4	18	634,89	158,95	4	4	857,76	505,75
5	11	682,69	147,07	5	3	984,86	231,05
6	3	737,16	86,35	6	3	4053,40	3773,40
K	55	259,50	131,78	K	55	259,50	131,78
	P	$<$ 0,01			P	$>$ 0,05	

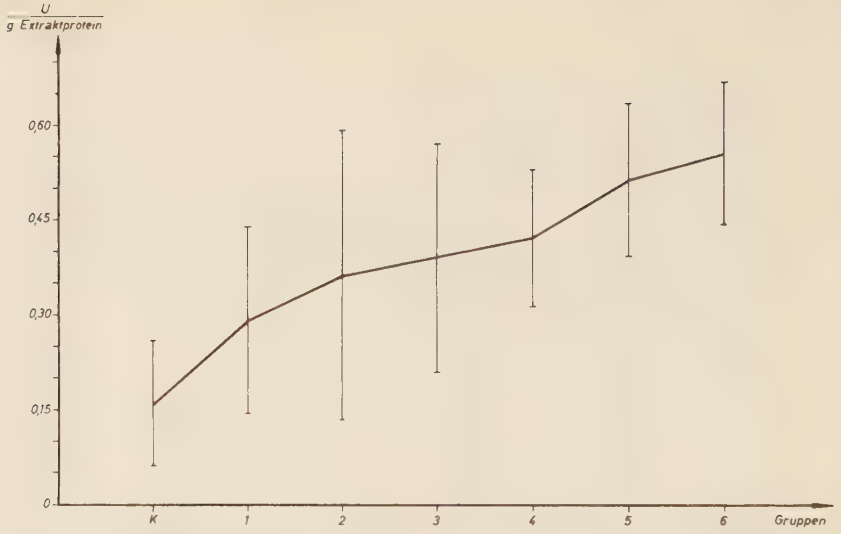


Abb. 9 Spezifische-proteinbezogene Aktivität der AP

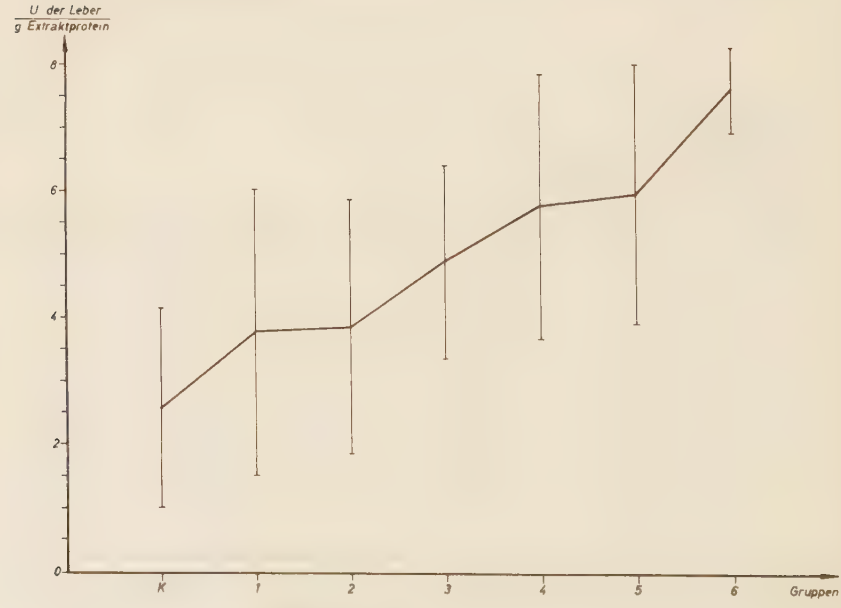


Abb. 10 Proteinbezogene Gesamtaktivität der AP

Tabelle 9

Spezifische-proteinbezogene EA der AP
(mU/g Extraktprotein)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	360,51	225,52	1	-	-	-
2	20	158,47	102,20	2	-	-	-
3	21	393,48	177,05	3	-	-	-
4	18	418,65	115,79	4	4	361,42	129,83
5	11	512,21	118,47	5	3	511,21	7,72
6	3	557,35	104,63	6	3	1366,50	1222,50
K	55	292,01	150,57	K	55	292,01	150,57
	P	$<$ 0,01			P	$>$ 0,05	

Tabelle 10

Proteinbezogene Gesamtaktivität der AP
(mU/g Extraktprotein x Leber)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	3762,8	2298,5	1	-	-	-
2	20	3834,1	2039,4	2	-	-	-
3	21	4907,3	1505,9	3	-	-	-
4	18	5760,6	2091,0	4	4	8684,3	3790,6
5	11	5929,4	2100,3	5	3	9505,5	5931,5
6	3	7587,9	677,2	6	3	30391,0	3126,1
K	55	2553,2	1596,9	K	55	2553,2	1596,9
	P	$<$ 0,01			P	$>$ 0,05	

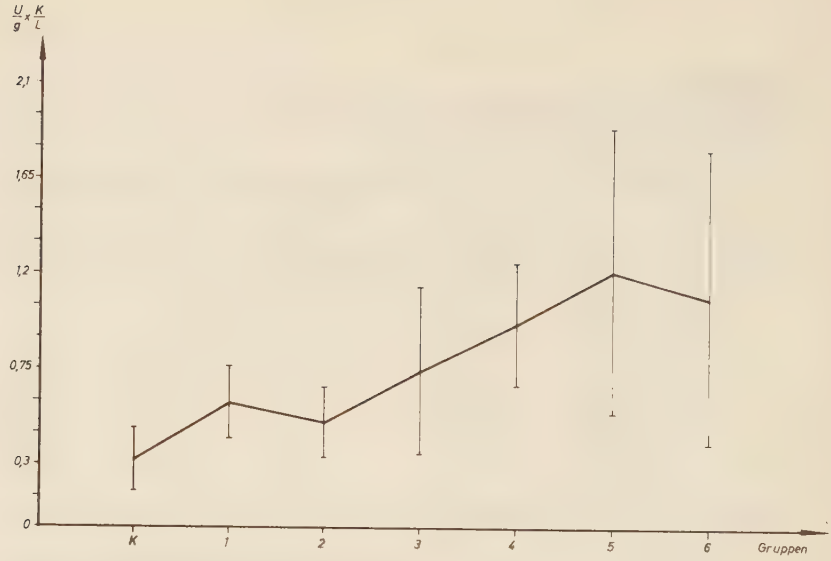


Abb. 11 Spezifische AP-Aktivität × Körpergewicht/Lebergewicht

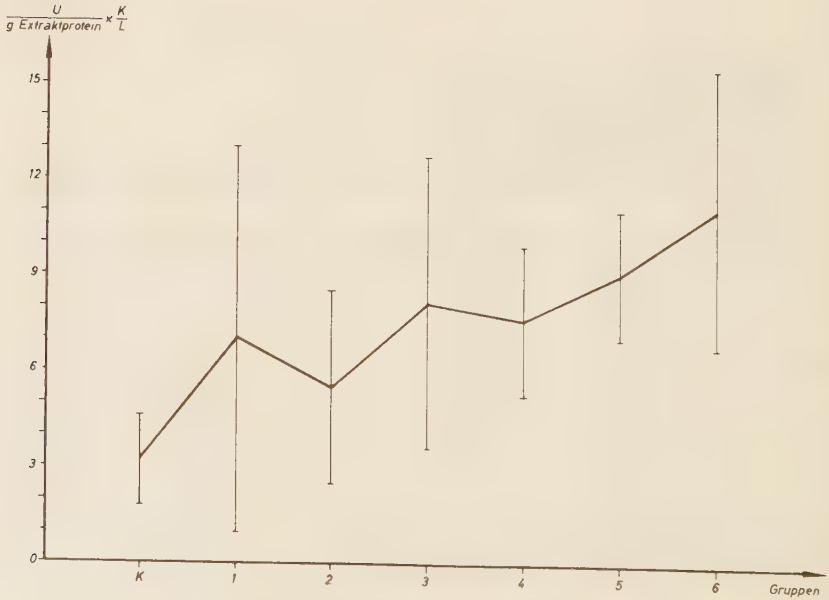


Abb. 12 Spezifische-proteinbezogene AP-Aktivität × Körpergewicht/Lebergewicht

Tabelle 11

Spezifische EA der AP x Körpergewicht / Lebergewicht
(mU / g Leber x K / L)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	576,80	171,74	1	-	-	-
2	20	506,05	217,23	2	-	-	-
3	21	741,39	395,16	3	-	-	-
4	18	849,73	390,14	4	4	452,60	164,12
5	11	1204,10	686,64	5	3	756,51	380,99
6	3	1072,60	680,61	6	3	2020,40	1135,30
K	55	319,96	151,48	K	55	319,96	151,48
		P < 0,01				P > 0,05	

Tabelle 12

Spezifische-proteinbez. EA der AP x Körpergew. / Lebergew.
(mU / g Extraktprotein x K / L)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	7060,2	5966,8	1	-	-	-
2	20	5501,9	3005,5	2	-	-	-
3	21	8100,6	4596,9	3	-	-	-
4	18	7626,9	2363,1	4	4	4699,1	957,54
5	11	9558,8	5501,7	5	3	7436,4	1127,40
6	3	11203,0	4365,1	6	3	14888,0	10252,00
K	55	3188,6	1391,1	K	55	3188,6	1391,10
		P < 0,01				P > 0,05	

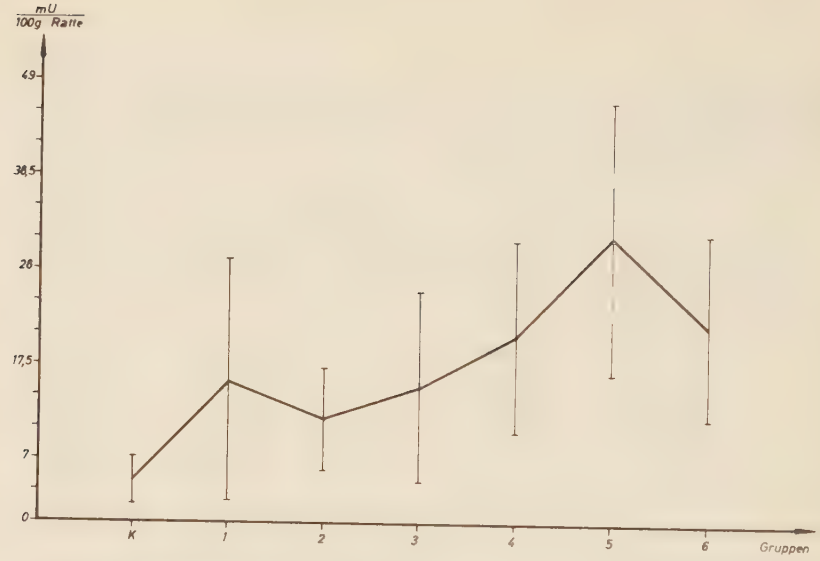


Abb. 13 AP-Aktivität / 100g Körpergewicht

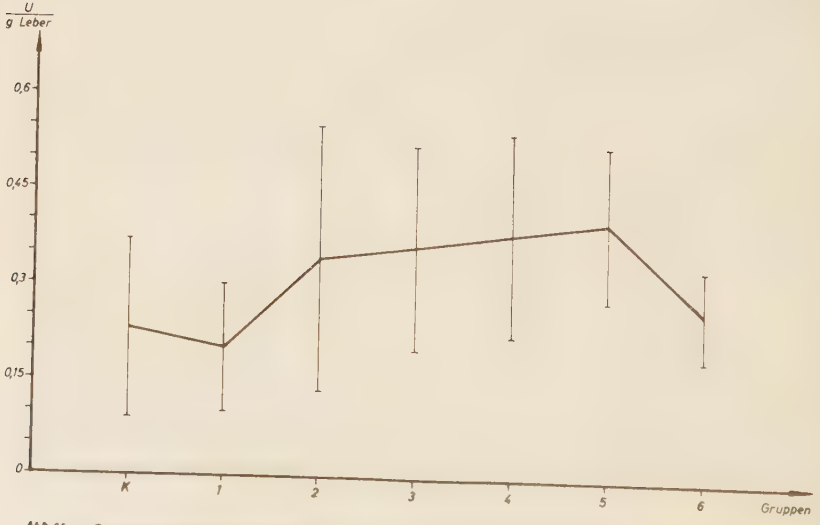


Abb. 14 Spezifische Aktivität der GLDH

Tabelle 13

EA der AP / 100 g Körpergewicht
(mU / 100 g K)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	15,52	13,99	1	-	-	-
2	20	11,29	5,77	2	-	-	-
3	21	14,89	10,70	3	-	-	-
4	18	20,05	11,16	4	4	11,82	7,41
5	11	31,75	14,94	5	3	20,26	8,19
6	3	21,75	10,09	6	3	77,40	66,98
K	55	4,95	2,34	K	55	4,95	2,34
		P < 0,01				P > 0,05	

Tabelle 14

Spezifische EA der GLDH
(mU / g Frischgewicht)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	204,85	95,62	1	-	-	-
2	20	249,80	209,65	2	-	-	-
3	21	368,19	158,08	3	-	-	-
4	18	386,28	153,75	4	4	130,00	29,44
5	11	402,18	125,18	5	3	100,00	14,14
6	3	267,00	64,86	6	3	133,33	15,28
K	55	230,85	145,88	K	55	230,85	145,88
		P < 0,01				P > 0,05	

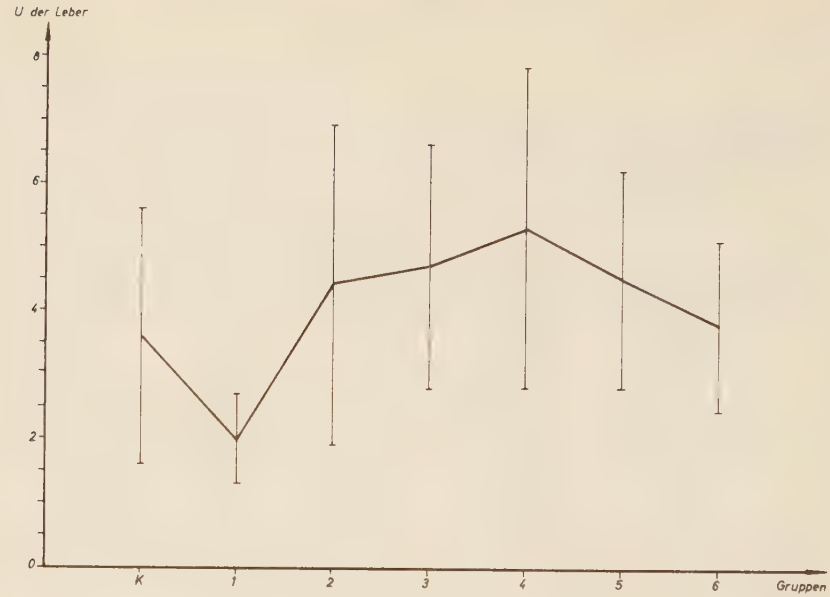


Abb. 15 Gesamtaktivität der GLDH

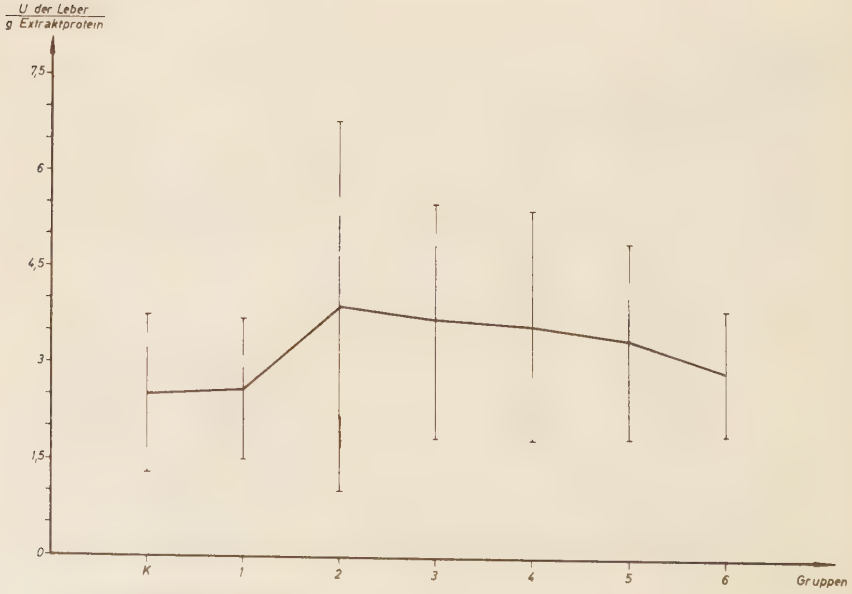


Abb. 16 Spezifische-proteinbezogene GLDH - Aktivität

Tabelle 15

Gesamtaktivität der GLDH
(mU im ganzen Organ)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	2071,4	651,8	1	-	-	-
2	20	4455,4	2463,8	2	-	-	-
3	21	4728,8	2000,0	3	-	-	-
4	18	5346,5	2516,1	4	4	3072,6	1125,3
5	11	4531,3	1682,8	5	3	1858,7	252,4
6	3	3947,2	1263,4	6	3	2782,8	757,0
K	55	3655,1	1970,7	K	55	3655,1	1970,7
	P	$< 0,01$			P	$> 0,05$	

Tabelle 16

Spezifische-proteinbezogene EA der GLDH
(mU / g Extraktprotein)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	2568,8	1140,6	1	-	-	-
2	20	3989,3	2804,4	2	-	-	-
3	21	3686,6	1851,4	3	-	-	-
4	18	3652,4	1829,4	4	4	1416,5	409,3
5	11	3371,0	1548,5	5	3	975,6	83,3
6	3	2773,0	787,9	6	3	924,9	259,0
K	55	2499,8	1220,6	K	55	2499,8	1220,6
	P	$> 0,05$			P	$> 0,05$	

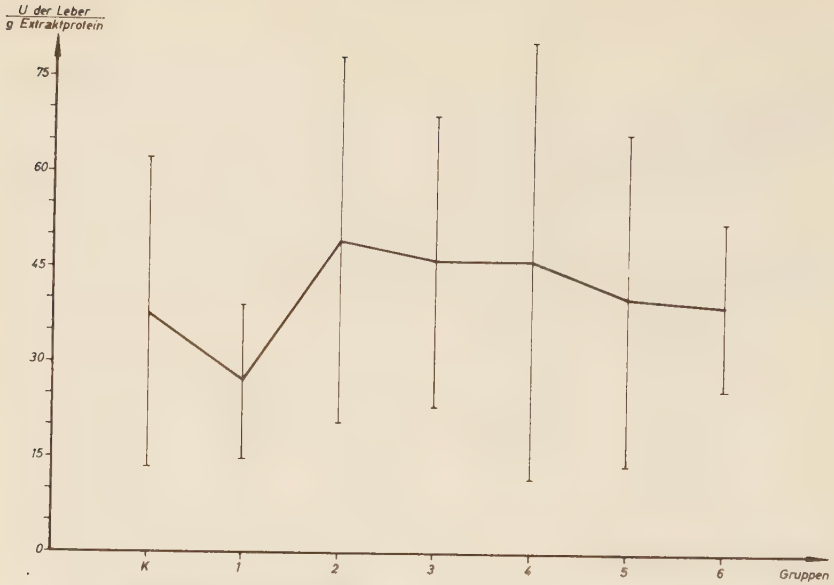


Abb. 17 Proteinbezogene Gesamtaktivität der GLDH

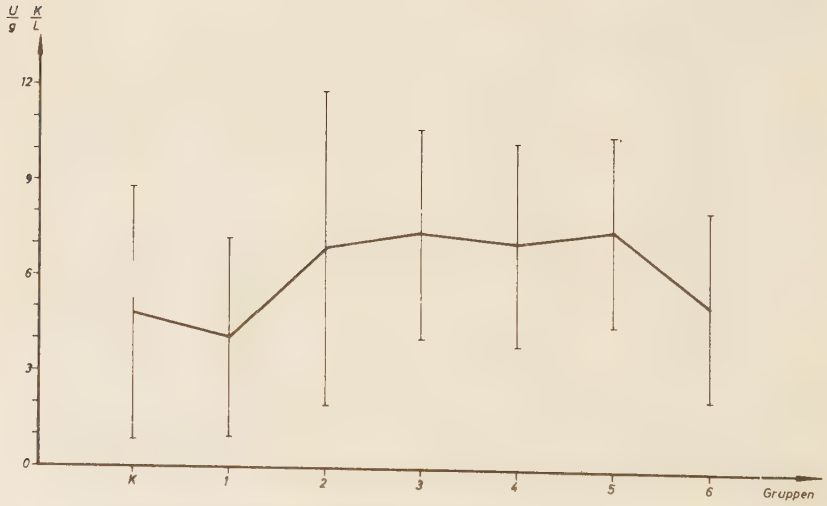


Abb. 18 Spezifische GLDH-Aktivität = Körpergewicht/Lebergewicht

Tabelle 17

Proteinbezogene Gesamtaktivität der GLDH
(mU / g Extraktprotein x Leber)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	27075	12121	1	-	-	-
2	20	49210	28826	2	-	-	-
3	21	46561	22935	3	-	-	-
4	18	51101	29492	4	4	33280	12354
5	11	40571	25996	5	3	18145	1653
6	3	39670	12982	6	3	19433	8024
K	55	37792	24872	K	55	37792	24872
		P > 0,05				P > 0,05	

Tabelle 18

Spezifische EA der GLDH x Körpergew. / Lebergew.
(mU /g Leber x K / L)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	4112,8	3164,7	1	-	-	-
2	20	6938,8	4936,0	2	-	-	-
3	21	7447,9	3253,1	3	-	-	-
4	18	7106,1	3238,8	4	4	1775,9	483,7
5	11	7528,9	2978,3	5	3	1439,3	36,6
6	3	5212,4	2962,0	6	3	1611,4	179,7
K	55	4857,2	3953,8	K	55	4857,2	3953,8
		P < 0,01				P > 0,05	

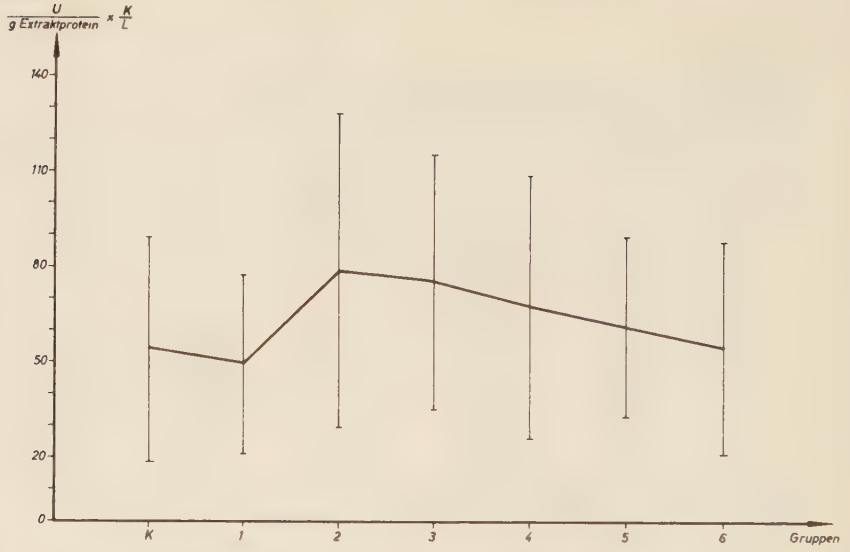


Abb. 19 Spezifische-proteinbezogene GLDH-Aktivität × Körpergewicht/Lebergewicht

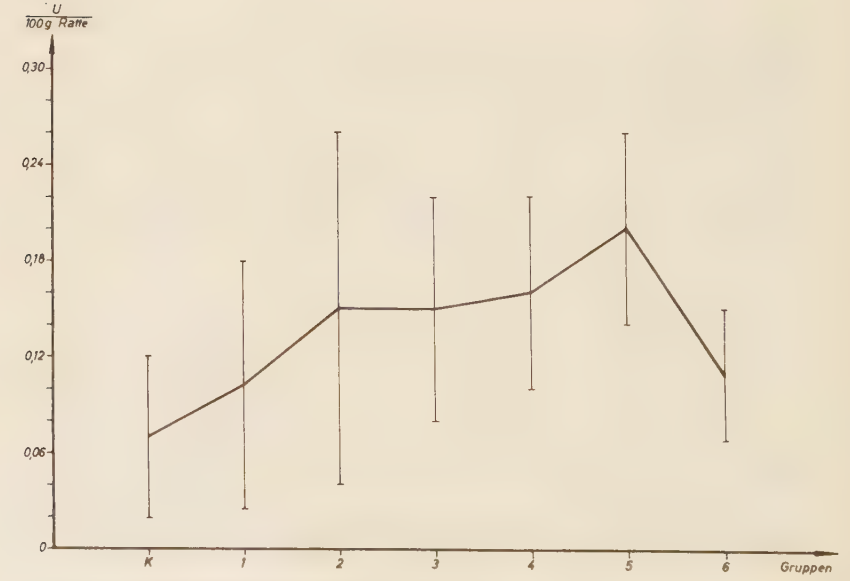


Abb. 20 GLDH-Aktivität / 100 g Körpergewicht

Tabelle 19

Spezifische-proteinbez. EA der GLDH x Körpergew. / Lebergew.
(mU / g Extraktprotein x K / L)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	49323	28143	1	-	-	-
2	20	78036	50130	2	-	-	-
3	21	75577	39830	3	-	-	-
4	18	67691	40505	4	4	19641	7232
5	11	61079	28037	5	3	14310	3579
6	3	54499	33126	6	3	11039	2309
K	55	53834	35449	K	55	53834	35449
		P > 0,05				P > 0,05	

Tabelle 20

EA der GLDH / 100 g Körpergewicht
(mU / 100 g K)

Gr	N	M	St	GrA	N	M	St
1	27	112,09	70,61	1	-	-	-
2	20	150,59	106,88	2	-	-	-
3	21	147,45	75,02	3	-	-	-
4	18	159,60	61,03	4	4	41,52	7,23
5	11	199,13	66,64	5	3	37,91	11,75
6	3	106,51	39,76	6	3	54,29	10,55
K	55	73,21	51,14	K	55	73,21	51,14
		P < 0,01				P > 0,05	

Abb.: 21

Die Regulierbarkeit der Aktivitäten (Spezifische Aktivitäten) ausgedrückt durch die Maxima als Vielfache der Minima

Kleinster gemessener Mittelwert = 1

Kontrollwert = K

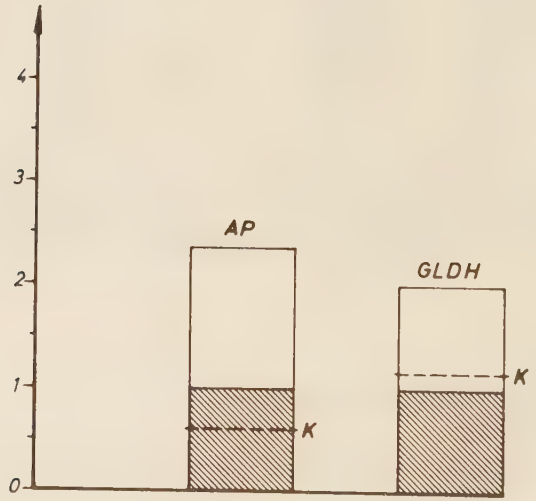


Abb. 21

D. Makroskopisch sichtbare Leberveränderungen im Bild

Abb.: 22
Gesunde, unveränderte Rattenleber

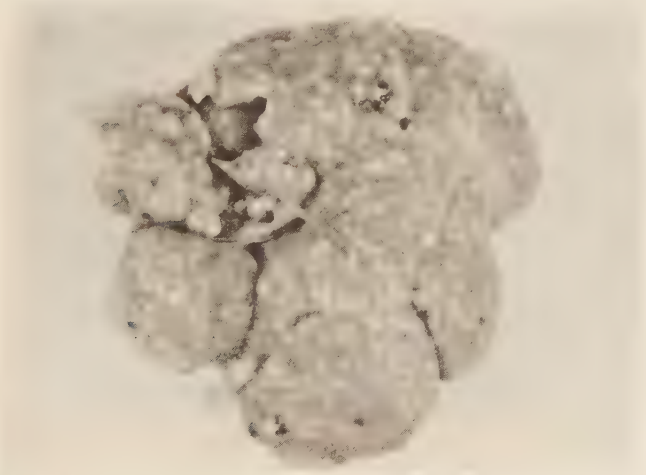


Abb.: 23
Stecknadelkopfgrosse Knötchen

Abb.: 24
Erbsengrosse Veränderungen

Abb.: 25
Erbsen- bis bohnengrosse Knoten mit beginnender Ulzeration

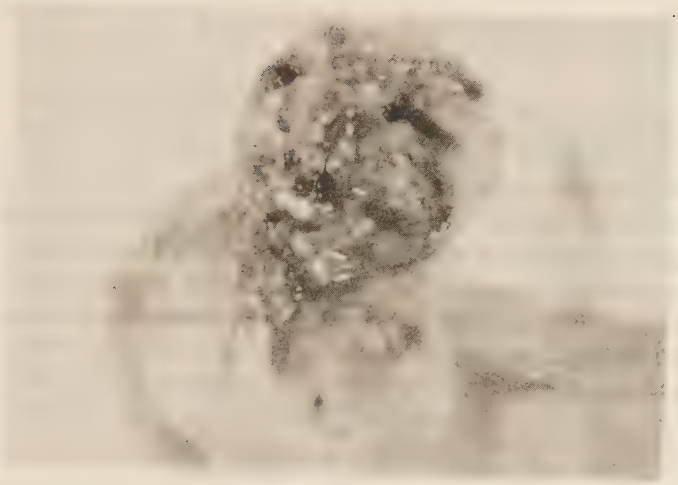


Abb.: 26
Ulzerierender Tumorknoten

V. DISKUSSION DER KURVEN

Alkalische Phosphatase:

In den von uns gewählten Bezugssystemen lässt sich ausnahmslos ein drastisches Ansteigen im Verlauf der toxischen Einwirkung erkennen. Diese ansteigende Tendenz ist am klarsten aus dem Bezugssystem der Enzymaktivität auf das gesamte Organ zu ersehen, aber auch die anderen Bezugssysteme zeigen im Prinzip dasselbe Verhalten. Der Anstieg war in allen Bezugssystemen mit $P < 0{,}01$ statistisch hochsignifikant.

Glutamat-Dehydrogenase:

Man kann feststellen, dass mit zunehmender Kanzerisierung die Aktivität dieses Enzyms unter dem toxischen Einfluss des Nitrosomorpholins anfänglich leicht abzusinken scheint, um mit zunehmender Schädigung der Leber auf ein höheres Niveau anzusteigen. Erst im letzten Stadium der mit groben Knoten durchsetzten Leber ist wieder ein Absinken der GLDH zu verzeichnen.

VI. D I S K U S S I O N

Wie schon oben erwähnt, haben wir sehr verschiedene Systeme für die Gruppenbildung geprüft.

Ursprünglich hatten wir vor, die Tiere nach der Tränkungsdauer mit der NNM-Lösung zu gruppieren. Wir haben dieses System auch durchgerechnet. Erwartungsgemäss lässt sich hierbei kein charakteristisches Verhalten der Enzymaktivitäten erkennen, da die gleiche Tränkungsdauer eben nicht bei allen Tieren zu einem gleichen Ausmass der Bildung von Krebszellen führt. Die Tiere reagieren doch sehr unterschiedlich, obwohl sie einem Inzuchtstamm angehörten. Der Züchter unserer Tiere hält diesen Wistarstamm seit elf Jahren durch ständiges Miteinanderkreuzen, so dass man bei der kurzen Generationsfolge der Ratten ein weitgehend homogenes genetisches Material erwarten kann. Da aber auch die Tiere nicht nur von der Erbanlage, sondern auch von den Umweltbedingungen beeinflusst werden, führt z. B. das soziologische Verhalten der Tiere zu einer unterschiedlichen Aufnahme von Futter und NNM.

Auch eine Klassifizierung nach der wahrscheinlich inkorporierten NNM-Menge führte nicht weiter, da man diese nur grob abschätzen kann. Wir haben dabei die Trinkmenge/Tag gewogen und daraus die durchschnittliche Trinkmenge eines jeden Tieres/Käfig errechnet. Letztlich sollte man aber die inkorporierte Menge nur dann als Bezugssystem wählen, wenn man die kanzerogene Substanz injiziert oder wenigstens durch die Schlundsonde zwangsweise verfüttert hat.

Das einzig vernünftige Bezugssystem für die Gruppierung unserer Tiere schien uns das zu sein, was uns vor den Augen lag.

Ausgehend von der gesunden, unveränderten Leber, beobachteten wir, über eine Konsistenzvermehrung, die sich beim Homogenisieren bemerkbar machte, eine rauhe Oberfläche, stecknadelkopfgrosse, reiskorngrosse, erbsengrosse bis endlich bohnengrosse Knoten. Diesen Veränderungen muss auch eine Zunahme der erfassten Tumorzellmasse entsprechen.

Parallel zu diesen Veränderungen untersuchten wir zwei auch in der klinischen Hepatologie wichtige Enzyme und deren Aktivitätsänderungen während der Kanzerisierung. Das unterschiedliche Verhalten der Enzymaktivitäten, der kontinuierliche Anstieg der AP auf etwa das Vierfache und der Anstieg der GLDH auf das Doppelte, zeigt uns, dass wir durch unsere Gruppierung ein biologisches Geschehen erfasst haben, dessen Bedeutung noch nicht völlig zu verstehen ist.

Der Anstieg der AP kann auf eine vermehrte Produktion in den Tumorzellen oder auf eine vermehrte Produktion in den noch funktionsfähigen Hepatocyten zurückzuführen sein. Hier müssten histochemische Untersuchungen Klarheit bringen. Durch den Tumor könnte es aber auch zu einer Gallenstauung kommen und diese Gallenstauung könnte die normale Ausscheidung der AP, die in hoher Aktivität in der Galle vorkommt, verursachen.

Die GLDH ist ein Enzym, das in den Mitochondrien lokalisiert ist. Die geringen Veränderungen in diesen "Kraftwerken" der Zelle hat uns zunächst enttäuscht. Wir haben gehofft, grosse Veränderungen der EA zu finden.

Die geringen Veränderungen der GLDH und auch die des Citronensäurecyclus lassen sich vielleicht so deuten, dass auch die Krebszelle noch eine Körperzelle ist, die, solange sie lebendig bleibt, biologischen Gesetzmässigkeiten unterworfen ist, dass z.B. der Energieumsatz in den Mitochondrien nicht sinnloserweise uferlos gesteigert werden kann. Der Anstieg der GLDH auf das Doppelte ist vielleicht mit dem Einschmelzen des Körpereiweisses, das bei Krebskranken ein hervorstechendes Merkmal ist, in Verbindung zu bringen. Dieses Enzym katalysiert folgende Reaktion:

$$\alpha\text{-Ketoglutarat} + NH_4^+ + NADH_2 \xrightleftharpoons{GLDH} \text{L-(+)Glutamat} + NAD + H_2O$$

Durch diese Reaktion wird aus einer Aminosäure durch Desaminierung Ammoniak freigesetzt, was letztlich in der Leber in Harnstoff umgewandelt wird. Dazu passt, dass in einer parallelen Untersuchung (43) ein Harnstoffanstieg gefunden wurde.

VII. Z U S A M M E N F A S S U N G

An 100 weissen Inzuchtratten vom Stamm Wistar B 47 untersuchten wir die Enzymaktivitäten der Alkalischen Phosphatase und der Glutamat-Dehydrogenase nach Verabreichung des chemischen Kanzerogens N-Nitrosomorpholin. Die Tiere wurden mit einer 12 mg% NNM-Lösung getränkt. Da dieses Kanzerogen stark organotrop wirksam ist, zeigten sich schon nach ganz kurzer Versuchsdauer makroskopisch sichtbare Veränderungen des Lebergewebes. Diese pathologisch-anatomischen Erscheinungen machten wir zur Grundlage unserer Gruppeneinteilung, nachdem uns zwei andere Bezugssysteme, - die Tränkungsdauer und die Tränkungsmenge - nach langen Überlegungen unzulänglich erschienen. Auf diese Weise konnten wir Tiere in einer Gruppe erfassen, die im Prozess der Kanzerisierung auf etwa der gleichen Stufe stehen. Die genaue Prüfung der anderen Systeme zeigte, dass unsere Ergebnisse zu stark verwässert worden wären, da das Material aus den einzelnen Gruppen zu heterogen gewesen wäre.

Unsere ermittelten Enzymaktivitäten wurden in folgende Beziehungen gesetzt:

a) Spezifische Aktivität
b) Gesamtaktivität
c) Spezifische proteinbezogene Aktivität
d) Proteinbezogene Gesamtaktivität
e) Spezifische Aktivität x $\frac{\text{Körpergewicht}}{\text{Lebergewicht}}$
f) Spezifische proteinbezogene Aktivität x $\frac{\text{Körpergew.}}{\text{Lebergew.}}$
g) Aktivität/100 g Körpergewicht

Die erhaltenen Werte wurden statistisch berechnet. Die Einzelergebnisse stellten wir in Tabellen und Abbildungen dar. Bei beiden untersuchten Enzymen zeigte sich ein Anstieg ihrer Aktivitäten. Die AP erreichte etwa das Vierfache des Ausgangswertes, die GLDH stieg nur auf das Doppelte ihres Ausgangswertes an. Wir haben mit unseren Untersuchungen ein biologisches Geschehen erfasst, dessen Bedeutung noch nicht zu verstehen ist. Die Kanzerisierung führt zu einer auch an den Aktivitäten der untersuchten Enzyme messbaren Änderung der Stoffwechselwege.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. H. Haug danke ich für die Überlassung des Themas, seine ständige Hilfsbereitschaft und die Übernahme des Referates.

Mein weiterer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. H. Franke für die Übernahme des Korreferates.

Für die Hilfe bei mathematischen Fragen der statistischen Auswertung der Arbeit danke ich Herrn Dr. B. Knauer.

VIII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ALLARD, C. und DE LAMIRANDE:
Behavior of Enzymes in Liver Carcinogenesis-Glutamic-Dehydrogenase, Glutamic-Oxalacetic-Transaminase and Glutamic-Pyruvic-Transaminase. Proceeding of the American Association for Cancer Research 10-12, 1-2, 1959

2. ALTMANN, H.-W.:
Vorlesung: Allgemeine Pathologie

3. BANNASCH, P. :
The Cytoplasm of Hepatocytes during Carcinogenesis. Recent Results in Cancer Research 19, 1968

4. BANNASCH, P.:
Experimentelle Glykogenspeicherkrankheit und Geschwulstbildung in der Leber.
Fortschritte in der Medizin, 10, 409-412, 1969

5. BANNASCH, P. und H. A. MÜLLER:
Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von N - Nitrosomorpholin auf die Leber von Ratte und Maus.
Arzneimittelforsch. 14, 805-814, 1964

6. BECKER, H.:
Zahnmed. Diss. Würzburg 1971

7. BERNASEK, G.:
Der Organismus als Ganzes und die Geschwulstzellen.
Arch. f. Geschwulstforsch. 11, 290-293, 1957

8. BRÜHL, W.:
Leber und Gallengangserkrankungen 1966

9. BURKHARDT, B.:
Zahnmed. Diss. Würzburg 1970

10. BÜCHER, T.: Enzyme unter biologischem Aspekt (Erbliche Stoffwechselkrankh.,Linneweh F., 1962)

11. CANTAROW, A.:
Amer. J. Physiol. 153, 444, 1948

12. DONTENWILL, W. und MOHR, U.:
Die organotrope Wirkung der Nitrosamine.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 65, 166-167, 1962

13. DRUCKREY, H. , P. DANNENBERG, D. SCHMÄHL, M, MÜLLER
Chem. Konstitution und carcinogene Wirkung bei Nitrosaminen.
Naturwissenschaften 48, 134-145, 1961

14. DRUCKREY, H. ,S. IVANKOVIC, H. D. MENNEL und R. PREUSSMANN:
Selektive Erzeugung von Carcinomen der Nasenhöhle bei Ratten durch N 'N'-Di-Nitrosopiperidin, Nitrosomorpholin, Methyl-allyl-, Dimethyl-und Methyl-vinyl-nitrosamin.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 66, 138-149, 1964

15. DRUCKREY, H. und KUPFMÜLLER K.:
Dosis und Wirkung
Cantor Aulendorff / Württbg. , 1949

16. DRUCKREY, H. , R. PREUSSMANN:
Naturwissenschaften 49, 111, 1962

17. DRUCKREY, H. R. PREUSSMANN, G.BLUM, S. IVANKOVIC:
Naturwissenschaften 50, 99, 1963

18. DRUCKREY, H. , R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC,D. SCHMÄHL:
Organotrope carcinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-Nitrosoverbindungen an BD-Ratten.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 69, 103-201, 1967

19. DRUCKREY, H. , D. SCHMÄHL, W. DISCHLER, A. SCHILDBACH:
Quantitative Analyse der experimentellen Krebserzeugung.
Naturwissenschaften 49, 111, 1962

20. DRUCKREY, H. D. STEINHOFF, R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC:
Erzeugung von Krebs durch eine einmalige Dosis von Methyl-nitroso-harnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen an Ratten.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 66, 1-10, 1964

21. DYER, H.,P. GULLINO, B. ENSFIELD, P. MORRIS:
Transaminase Activities of Liver Tumors and Serum.
Cancer Research 21, 1522-1531, 1961

22. EDWARDS, I. and I. WHITE:
Pathologic changes, with special reference to pigmentation and classification of hepatic tumors in rats fed p-dimethyl-amino-azobenzene.
I. Nat. Cancer Inst. (Bethesda) 2, 157, 1942

23. FIALA, S. and A. E. FIALA:
On the Correlation between Metabolic and Structural Changes during Carcinogenesis in Rat Liver.
British Journal of Cancer, 13, 136-151, 1959

24. FISHMAN, W. H.:
The Pathologie of Cancer by 32 Authors.
Second Edition 732-754

25. FRIEDRICH-FRESKA, H., W. GOSSNER und P. BÖRNER:
Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach Dauergaben von Diäthylnitrosamin.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 72, 226-239, 1969

26. GRAFFI, A.:
Betrachtungen zu den Theorien der Krebsentstehung.
Arch. f. Geschwulstforsch. 22, 13-39, 1963

27. GRUNDMANN, E. und H. SIEBURG:
Die Histogenese und Cytogenese des Lebercarcinoms der Ratte durch Diäthylnitrosamin im lichmikroskopischen Bild.
Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie 126, 57-89, 1962

28. GÜRSTNER, A.:
Med. Diss. Würzburg 1969

29. HAMPERL, H.:
Allgemeine Pathologie u. patholog. Anatomie.
S. 251, 1966

30. HERZOG, G.:
Zahnmed. Diss. Würzburg 1971

31. HOFFMANN, F. und A. GRAFFI:
Nasenhöhlentumoren bei Mäusen nach percutaner Diäthylnitrosaminapplikation.
Arch. f. Geschwulstforsch. 23, 274-288, 1964

32. JAFFE, R.:
Beitrag zur Frage der Morphogenese der Leberveränderungen und Lebertumoren an Hand von Versuchen mit durch Buttergelb erzeugten Lebertumoren.
Frankf. Z. Path. 59, 42, 1947

33. JOSHIDA, T.:
Zit. nach Sasaki und Joshida
Virch. Arch. path. Anat. 295, 175, 1935

34. KENDREY, und NEMETH:
Über die Histogenese der durch Thioacetamid induzierten Lebercarcinome.
Arch. f. Geschwulstforsch. 26, 1-9, 1965

35. KINOSITA, R.:
Studies on the carcinogenic chemical substances.
Trans. Soc. Path. Jap. 27, 665-725, 1937

36. KREUTZ, F. H.:
Klinisch-chemische Untersuchungen bei Leberkrankheiten.
Der Internist Jg. 7, Heft 1, 1966

37. KUHN, O. und KOECKE, H. U.:
Untersuchungen zur lokalen Einwirkung von Methylcholantren auf die Leber der Maus und der Frage des primären Lebercarcinoms.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 62, 25-37, 1957

38. LAMBERS, K.:
Cytochemische Untersuchungen an Blutzellen für die Klinik der Blutkrankheiten.
Der Internist Jg. 1, Heft 6, 1960

39. LANGER, E.:
Kernveränderungen an Rattenlebern unter Einwirkung des cancerogenen Stoffes 4-Dimethylaminoazobenzol.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 52, 443, 1954

40. LAUBER,und DANNENBERG:
Zur Morphologie der durch p-Dimethylamino-azo-benzol erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 61, 327-345, 1956

41. LEHMANN, F. G., G. PFLEIDERER, HOPPE-SEYLERS:
Z. physiol.Chem. 350, 609, 1969

42. LEHMANN, F. G.:
VI. Glutamatdehydrogenase in primären Leberzellcarcinomen.
Klin. Wschr. 49, 1065-1073, 1971

43. LEIMEISTER, P.:
Zahnmed. Diss. in Druck

44. LETTERER, E.:
Allgemeine Pathologie
Leipzig 1969

45. LEUTHARDT:
Lehrbuch der physiologischen Chemie
Berlin 1957

46. LUDEWIG, S. and A. CHANUTI:
Distribution of Enzymes in the Livers of Control and X-Irradiated Rats.
Arch. Biochem. Biophys. 29, 441, 1950

47. MAGEE,P. N. and J. M. BARNES:
The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethyl-nitrosamine.
Brit. J. Cancer 10, 114-122, 1956

48. Mc D. HEROLD, K.:
Effect of Route of Administration on the Carcinogenic Action of Diethylnitrosamine.
Brit. J. Cancer 18, 763-767, 1964

49. MORRIS, H. P.:
Some Growth,Morphological and Biochemical Characteristics of Hepatoma 5123 and other New Transplantable Hepatomas.
Fortschritte der experimentellen Tumorforsch. 3, 394-397, 1963

50. MÜLLER, H. A.:
Morphologische Untersuchungen zur Wirkung von N-Nitrosomorpholin auf die Lunge der Maus.
Zeitschr. f. Krebsforsch. Bd. 66, 1964

51. OPIE, E. L.:
The pathogenesis of tumors of the liver produced by butter yellow.
J. exp. Med. 80, 231-246, 1944

52. OPIE, E. L.:
Mobilisation of basophile substance (ribonucleic acid) in the cytoplasm of liver cells with the production of tumors by butter yellow.
J. exp. Med. 84, 91-106, 1946

53. PORTER, K. R. und C. BRUNI:
An electron microscope study of the early effects of 3'-Methyl-DAB on rat liver cells.
Cancer Research 19, 997-1009, 1959

54. PROSCH, W.:
Zahnmed. Diss. Würzburg 1970

55. RICHARDSON, H. and E. BORSOS-NACHTNEBEL:
Study of liver tumor developement and histologic changes in other organs in rats fed azo dye 3-Methyl-4-Dimethyl-aminoazobenzene.
Cancer Research, 11, 389,1951

56. ROUS, O.:
Opening Remarks
Cancer Research , 20, 672-676, 1960

57. SANDNERund BÜRKLE:
Induktion maligner Tumoren bei Ratten durch gleichzeitige Verfütterung von Nitrit und sekundären Aminen.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 73, 54, 1969

58. SCHAUM, W.:
Med. Diss. Würzburg 1970

59. SCHMÄHL, D. F. W. KRÜGER:
Fehlen einer carcinogenen Wirkung von Dimethylnitrosamin bei Ratten.
Zeitschr.f. Krebsforsch. 73, 191-192, 1970

60. SCHMÄHL, D. und R. PREUSSMANN:
Cancerogene Wirkung von Nitrosodimethylamin bei Ratten.
Naturwissenschaften 46, 175, 1959

61. SCHMÄHL,D. und R. PREUSSMANN:
Leber-krebs-erzeugende Wirkung von Diäthyl-nitrosamin nach oraler Gabe bei Ratten.
Naturwissenschaften 47, 89, 1960

62. SCHMÄHL, D. und C. THOMAS:
Erzeugung von Lungen und Lebertumoren bei Mäusen mit N 'N'-Dinitrosopiperazin.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 11-14, 1965

63. SCHMÄHL, D., C. THOMAS und K. KÖNIG:
Experimentelle Untersuchungen zur "Synkarcinogenese" ; I. Mitteilung
Versuche zur Krebserzeugung an Ratten bei gleichzeitiger Applikation von Diäthyl-nitrosamin u. 4-Dimethylamino-azobenzol.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 342, 1963

64. SCHMÄHL, D., C. THOMAS und K. KÖNIG:
Leberkrebserzeugende Wirkung von Diäthyl-nitrosamin nach rektaler Applikation bei Ratten.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 65, 529-530, 1963

65. SCHMIDT, E., F. W. SCHMIDT, H. D. HORN u. U. GERLACH:
Die Bedeutung der Messung von Enzymaktivitäten in der Medizin .
"Methoden der Enzymatischen Analyse"
651-711, 1962

66. SCHWENTAL, R. und P. N. MAGEE:
Brit. J. Cancer 16, 92, 1962

67. SHEMISA, O. A. and L. A. FAHIEN:
Modifications of Glutamate Dehydronenase by Various Drugs Which Affect Behavior.
Molecular Pharmacology 7, 8-25, 1971

68. SIEGENTHALER, W.:
Klinische Physiologie
158-166, 1970

69. STILLINGS, B. R. and L. R. HACKLER:
Effect of Coprophagy on Protein Utilisation in the Rat.
J. Nutrition 90, 19, 1966

70. TERRACINI, B., G. PALESTRO, M. RAMELLAGIGLIARDI und R. MONTESANO:
Carcinogenity of Dimethylnitrosamine in SWISS MICE.
Brit. J. Cancer 20, 871-876, 1966

71. TESSMANN, D.:
Fermenthistochemische Untersuchungen zur Frage der Beeinflussung des Leberzellstoffwechsels durch Geschwulstmetastasen.
Arch. f. Geschwulstforsch. 179-187, 1962

72. THOMAS, C.:
Zur Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 64, 224-233, 1961

73. THOMAS, C. und D. SCHMÄHL:
Zur Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Lebertumoren bei der Maus und dem Meerschweinchen.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 65, 531-536, 1963

74. TOTH, B., P. N. MAGEE, P. SHUBIK:
Carcinogenesis Study with Dimethylnitrosamine Administrated Orally to Adult and Subcutanously to Newborn BALB/c MICE.
Cancer Research 24, 1712-1716, 1964

75. WEBER, G.:
Advances in Enzyme Regulation, Vol. 1
Pergamon-Press, Oxford-New York-Paris
S. 1, 1963

76. WEICHSELBAUM, T. E.:
Am. J. Clin. Path. 16, Tech. Sect. 10
S. 40, 1946

77. WOLF, H. P.:
Zahnmed. Diss. Würzburg 1970

L E B E N S L A U F

Am 13. Juni 1944 wurde ich als einziges Kind des Zahnarztes Rudolf Karger und seiner Ehefrau Maria, geb. Beier in Troppau/Sudetenland geboren.
Nach der Vertreibung im Jahre 1946 wohnte ich in Marxheim/Donau und besuchte dort von 1950-1955 die Volksschule. Bis 1964 war ich Schülerin am Realgymnasium in Donauwörth und bestand dort die Reifeprüfung.
Im Wintersemester 1964 begann ich an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg das Studium der Zahnmedizin.
Im April 1966 bestand ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung, im April 1968 die Zahnärztliche Vorprüfung.
Im August 1969 heiratete ich Herrn Dr. med. dent. Hanspeter Buchta.
Am 11. März 1971 erhielt ich vom Bayerischen Staatsministerium des Innern die Bestallung als Zahnärztin.

Ich versichere ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und ausser der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benützt habe.
Ich versichere ehrenwörtlich, dass ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Ilse Buchta

Schnelldruck-Böhler, 87 Würzburg, Seilerstr. 10